

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA DEFICIENCIA DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA EN TERNEROS HOLANDO, MEDIANTE qPCR-HRM



Liz Aurora Castro Rojas

Docente técnico
División de Patología Clínica.
Dpto. Patología y Clínica.
FCV-UNA

lcastro@vet.una.py



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY



INIA
Las Brujas

INIA
La Estanzuela

- » Atención: Alerta estré...
- » Importancia del sumin...

INIA
Salto Grande

- » VII Jornada de Riego
- » Investigación y Desar...

INIA
Tacuarembó

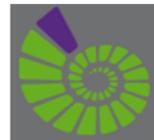
- » IUFRO en Uruguay
- » Congreso de la Asoci...

INIA
Treinta y Tres

- » Jornada de Divulgaci...
- » Gira de Cultivos de Ar...

“Estimación de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades que afectan la cría de los terneros lecheros del Uruguay e identificación de los principales factores asociados a sus frecuencias”

INIA
Las Brujas



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

INIA
La Estanzuela



Institut Pasteur
de Montevideo

Laboratorio de Virología Molecular



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República del Uruguay
Centro Universitario Región Litoral Norte
Sede Salto



DILAVE
División Laboratorios Veterinarios
Miguel C. Rubino



iibce INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

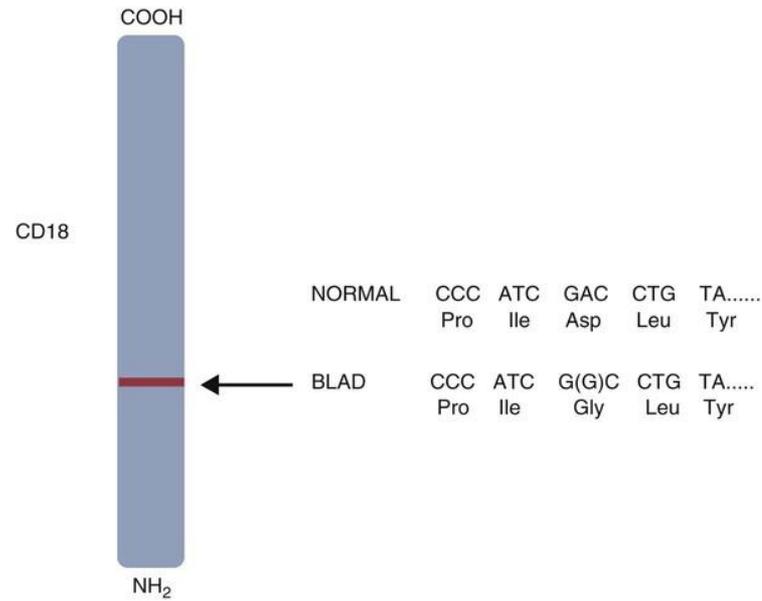


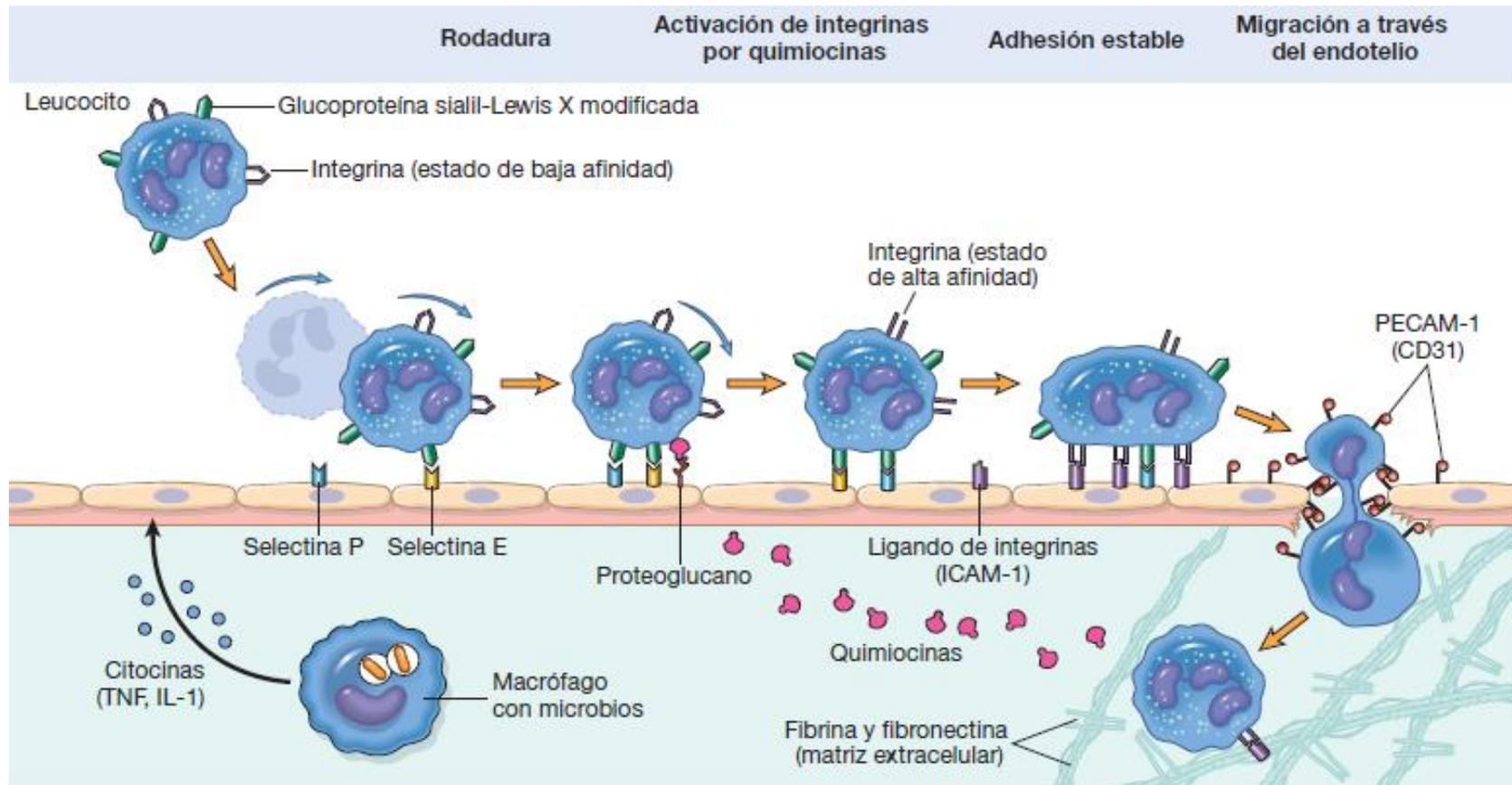
FVET Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

DEFICIENCIA DE LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA (BLAD)

Descrita 1983 en la raza Holando.

Enfermedad autosómica recesiva.





RESEARCH

Open Access



Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle

Rafeeqe R. Alyethodi[†], Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash

November 2011 Volume 94, Issue 11, Pages 5695–5698

Short communication: Distribution of recessive genetic defect carriers in Chinese Holstein

[D.X. Sun](#), [X.H. Fan](#), [Y. Xie](#), [Q. Chu](#), [Y. Sun](#), [Y. Zhang](#), [S.L. Zhang](#), [W.J. Gong](#), [S.H. Chen](#), [Y.H. Li](#), [W.H. Shi](#), [Y. Zhang](#) 



DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4345>

Genetics and Molecular Biology, 23, 4, 831-834 (2000)

PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil

Luciana A. Ribeiro¹, Erica E. Baron¹, Mário L. Martinez² and Luiz L. Coutin¹



Molecular and Cellular Probes

Volume 26, Issue 6, December 2012, Pages 259-262



Identification of a null allele in genetic tests for bovine leukocyte adhesion deficiency in Pakistani *Bos indicus* × *Bos taurus* cattle

Fozia Nasreen^{a, b, c}, Naveed A. Malik^{a, c}, Javed A. Qureshi^{a, c}, Herman W. Raadsma^{b, c}, Imke Tammen^{b, c}

 Show more

<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.01.004>

Get rights and content

ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, Vol. 19, n° 1, 052-056, 2003.

ISSN 0102-6380

FREQUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA NA ADESÃO LEUCOCITÁRIA EM UMA POPULAÇÃO DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA, NO URUGUAI.

(FREQUENCY OF LEUKOCYTE ADHESION DEFICIENCY IN A POPULATION OF HOLSTEIN-FRIESIAN CATTLE IN URUGUAY)

S. LLAMBÍ¹, K. GUEVARA², G. RINCÓN³, R. ZAFFARONI⁴, E. DE TORRES⁵, J. BARRERA⁶, M^a V. ARRUGA⁷, V. RODRÍGUEZ⁸, & A. POSTIGLIONI⁹

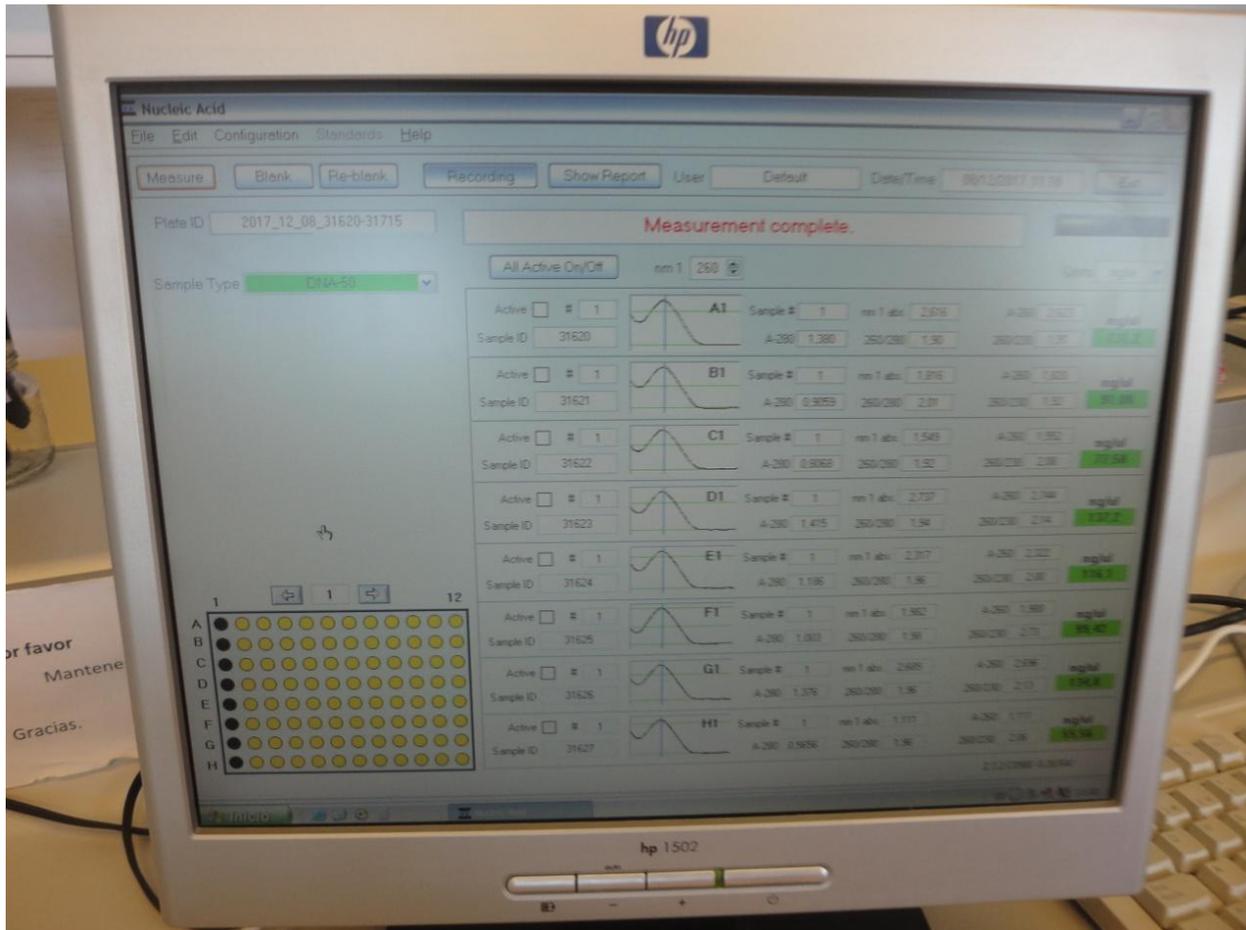
1. Recepción de 96 muestras de ADN, enviadas por la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) Treinta y Tres.



2. Medición de la CANTIDAD de ADN.



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”

| ID- laboratorio DILAVE TyT | Conc. (ng/μl) | A260/280 |
|---------------------------------|------------------|-------------|
| 1 | 69,42 | 1,48 |
| 9 | 22,46 | 1,84 |
| 10 | 27,41 | 2,25* |
| 17 | 48,95 | 1,63 |
| 21 | 19,49 | 1,92 |
| 23 | 30,53 | 1,65 |
| 25 | 11,3 | 2,15 |
| 28 | 41,24 | 2,07 |
| 33 | 18,56 | 2,15 |
| 40 | 19,63 | 2,28* |
| 41 | 19,72 | 2,18 |
| 46 | 25,28 | 2,25* |
| 47 | 12,01 | 2,09 |
| 54 | 14,5 | 2,25* |
| Control 1 portador (127) | 50 | 1,7 |
| Control 2 portador | 133,7 | 1,84 |
| Control 6 sano (50) | 50 | 1,7 |
| Control 7 sano (54) | 50 | 1,7 |

3. Amplificación por qPCR-HRM

| COMPONENTES | CONCENTRACIÓN FINAL | VOLÚMEN 1X |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 2 x HRM PCR Master Mix | 1X | 12,5 |
| BLAD 1 (Forward) 10 μ M | 0,7 μ M | 1,75 |
| BLAD 2 (Reverse) 10 μ M | 0,7 μ M | 1,75 |
| H ₂ O libre de RNase | variable | 8,5 |
| Total mix | | 24,5 |
| ADN (100 ng) | 50 ng | 0,5 |
| Volumen total | | 25 μl/tubo |

Type-it HRM PCR Kit

Catalog no.

Number of 25 μ l reactions

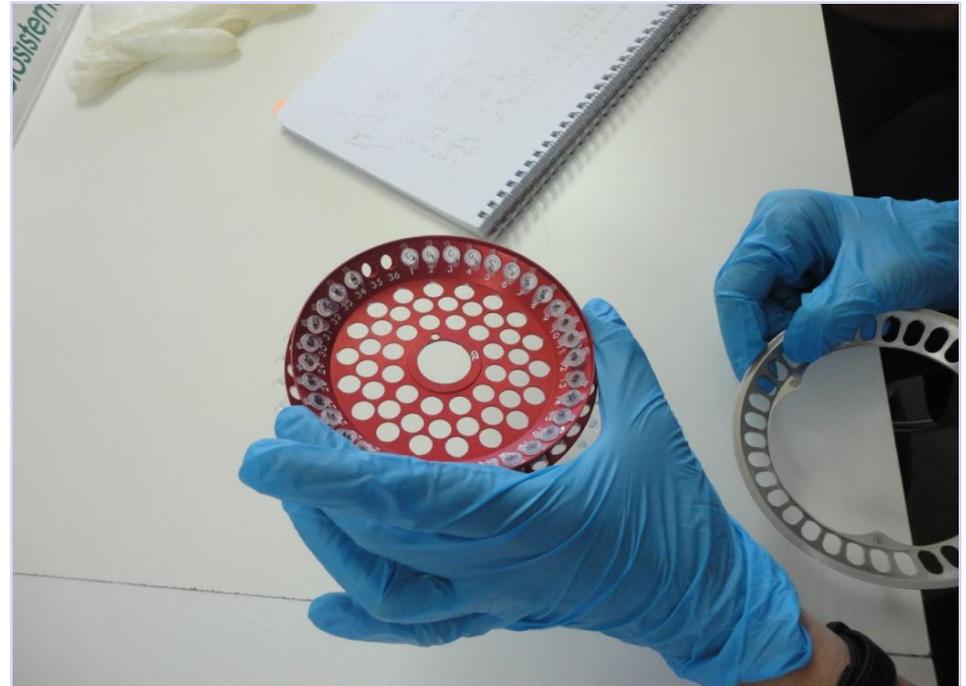
2x HRM PCR Master Mix containing:

- HotStarTaq[®] Plus DNA Polymerase
- Type-it HRM PCR Buffer (with EvaGreen[®] dye)
- Q-Solution[®]
- dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

RNase-Free Water



| Secuencia primers 5' a 3' | Producto de PCR | Referencia |
|--|-----------------|-----------------------------|
| F: AGGCAGTTGCGTTCAACGTGA R: CCGACTCGGTGATGCCATTGA | 159 pb | Llambí <i>et al.</i> , 2003 |



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”

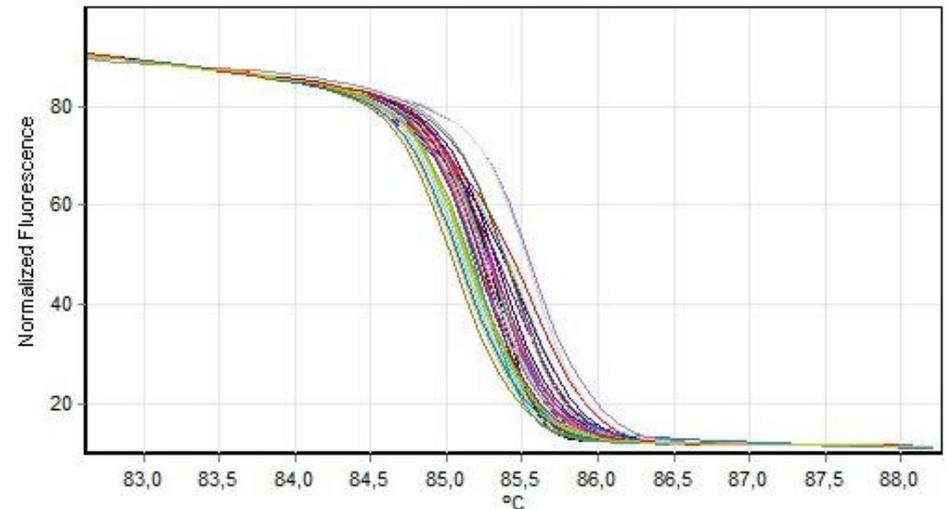
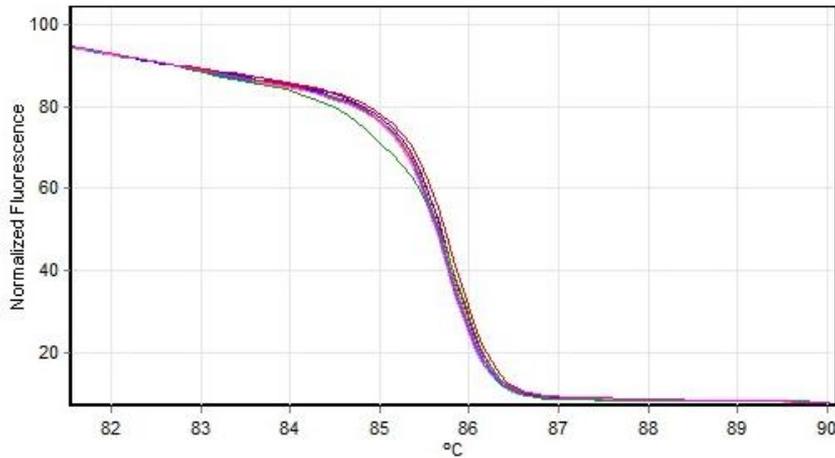
Condiciones de ciclado para PCR- HRM

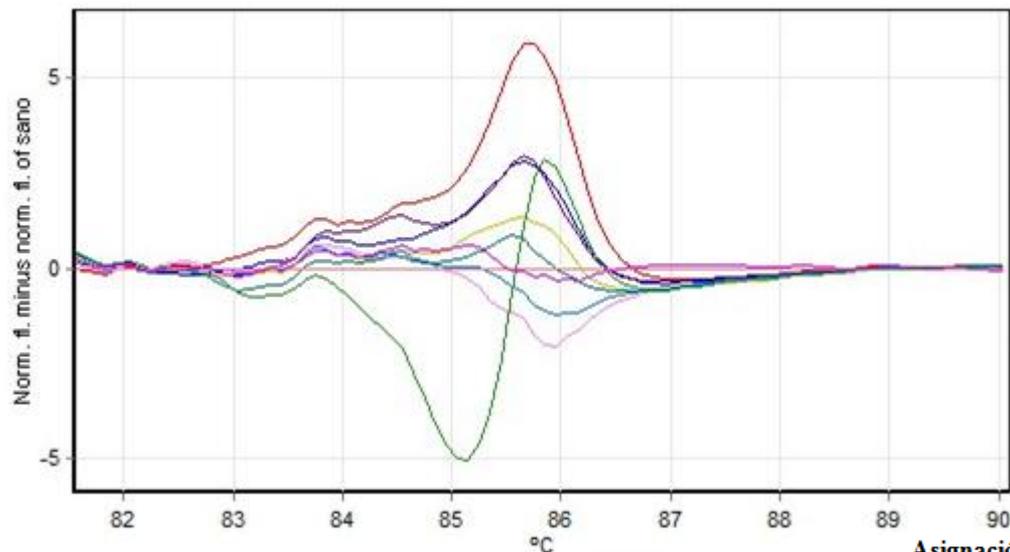
| Etapa | Temperatura | Tiempo |
|----------------------------|------------------------------|----------------|
| Activación del PCR inicial | 95°C | 5 min. |
| Desnaturalización | 95°C | 10 <u>seg.</u> |
| Hibridación | 55°C | 30 <u>seg.</u> |
| Extensión | 72°C | 10 <u>seg.</u> |
| Número de ciclos | 40 | |
| HRM | 65 - 95°C* 0,1°C incremental | 2 <u>seg.</u> |



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”

4. Análisis de las curvas de disociación, para la determinación de los genotipos homocigotas y heterocigotas.

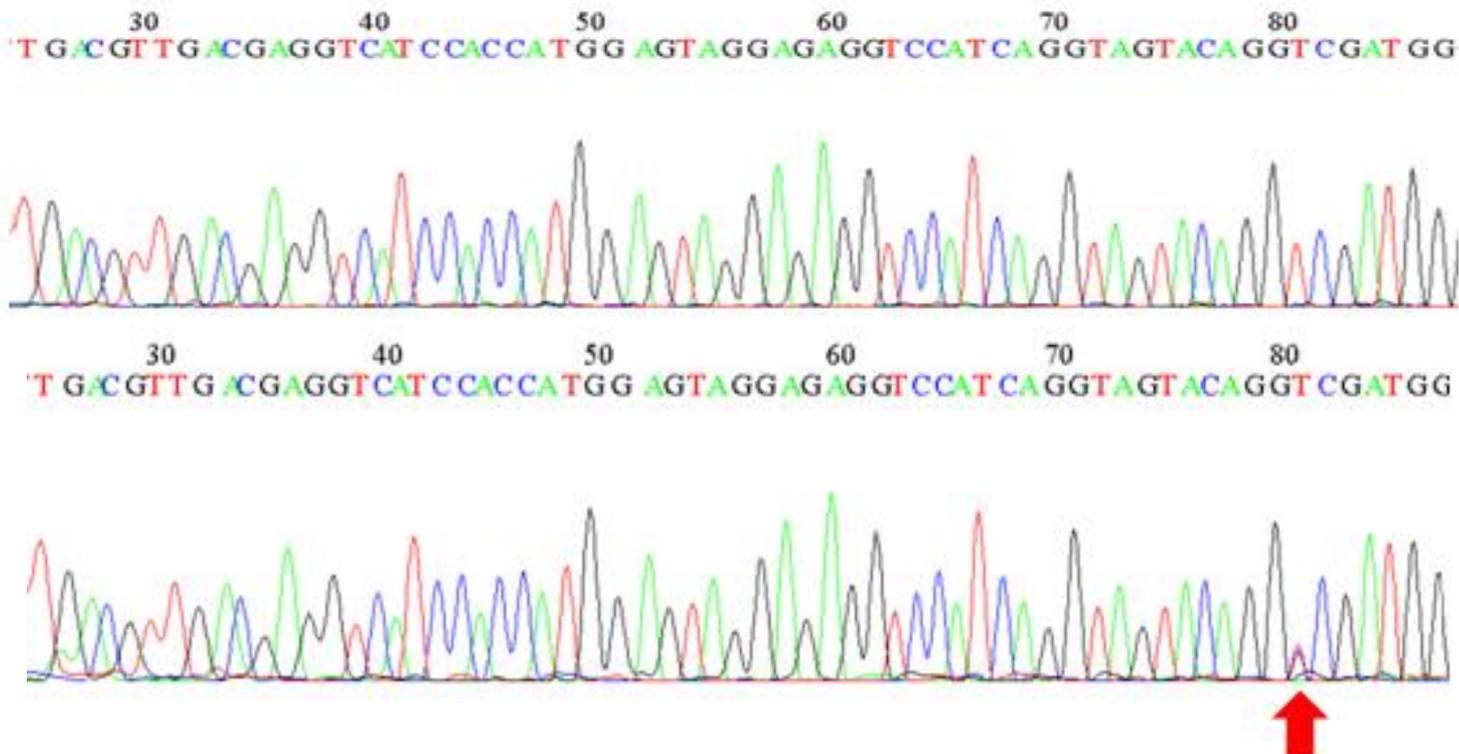




Asignación de los genotipos:

| No. | Color | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|--------------|------------------------|-----------|--------------|
| 1 | Red | T310-108 | Variation | |
| 2 | Yellow-green | 1873-T1 1078 | sano | 98,12 |
| 3 | Blue | 10149516-67 | sano | 93,67 |
| 4 | Purple | 8704 T1 1699 | sano | 93,13 |
| 5 | Pink | 1-355-16-67 | sano | 96,65 |
| 6 | Light blue | T313 16-69 | sano | 98,44 |
| 7 | Teal | 16063 13 | sano | 98,90 |
| 8 | Light red | 24 (control sano) | sano | 100,00 |
| 9 | Green | 127 (control portador) | portador | 100,00 |
| 10 | Magenta | 54 (control sano) | sano | 99,45 |

5. Análisis de los electroferogramas de los amplicones enviados a MACROGEN (Korea).



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”

ACTIVIDAD

Extracción de ADN a partir de muestras de semen

1. Haplotipos causantes de abortos HH1, HH2 y HH3.
2. Mutación causante de la enfermedad Braquiespina.
3. Haplotipo de Deficiencia del Colesterol (HCD).



Things to do before starting

- Prepare Buffer X2, as described above.
- Buffer ATL and Buffer AL may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 56°C until the precipitates have fully dissolved.
- Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform to 56°C for use in step 1.

Procedure

1. Place 100 μ l sperm in a microcentrifuge tube and add 100 μ l Buffer X2. Incubate at 56°C until the sample is dissolved (at least 1 h). Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a thermomixer, shaking water bath, or on a rocking platform.

2. Add 200 μ l Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 μ l ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure.

3. Pipet the mixture from step 2 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*
4. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at 20,000 $\times g$ (14,000 rpm).

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See DNeasy Blood & Tissue Handbook for safety information.



AltaJUPITER

011HO10662

SULLY ALTAJUPITER-ET

PLANET X SHOTTLE X O MAN

HOUSAM000066011448 | DOB 2/20/2009

aAa 531462 | DMS 345,135 | EFI 8.6 %

HH3

Kappa-Casein: AB Beta-Casein: A2A2

Current Proof: USA-201712

CDCB & HA-USA Genetic Evaluations 12/2017

TPI

1864

NMS

247



AltaUP P-RED

011HO00582

SCHREUR ALTAUP P-RED

PERFECT AIKO X LAWN BOY P-RED X SHOTTLE

HONLDM000757042533 | DOB 7/9/2014

aAa 234165 | DMS | EFI 9.1 %

HCD

Kappa-Casein: BB Beta-Casein: A2A2

Current Proof: USA-201712

CDCB & HA-USA Genetic Evaluations 12/2017

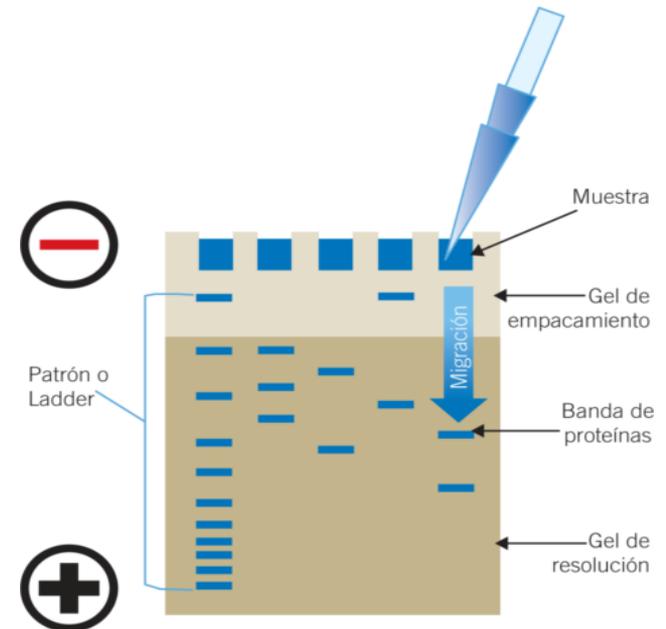
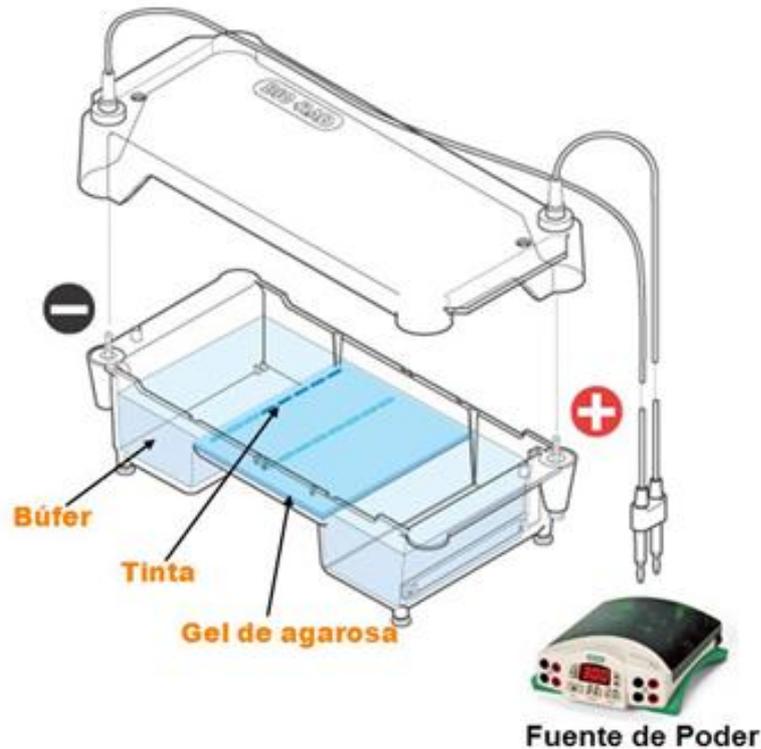
TPI

2300

NM\$

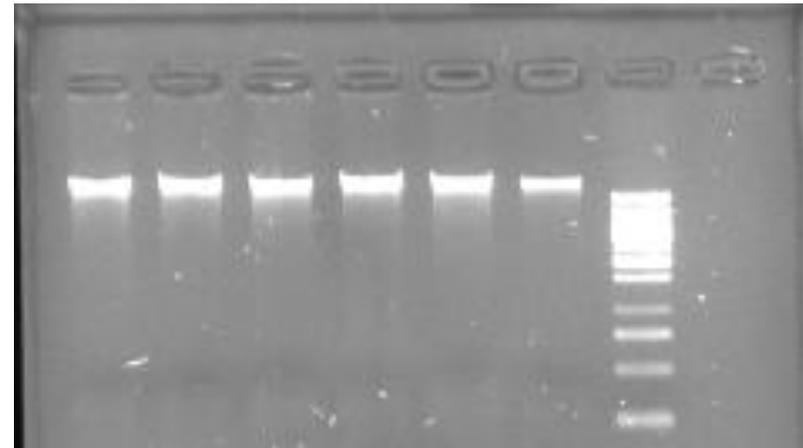
544

1. Determinar CALIDAD del ADN



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, 2e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

1. Determinar CALIDAD del ADN



2. Determinar CANTIDAD del ADN



“Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación en Investigación – FEEI”



1. OBJETIVO

Fortalecer las capacidades de capital humano en I+D a través de la vinculación de científicos y tecnólogos, en los sectores priorizados por el CONACYT.

El CONACYT financiará estancias presenciales de investigación y/o transferencia tecnológica a los efectos de que los/as postulantes puedan tener una participación relevante en: el dictado de cursos de posgrados y/o la realización y/o participación en eventos de divulgación científica y/o tecnológica, congresos, simposios, talleres docentes y de investigación, reuniones para el fortalecimiento de las líneas de investigación en las instituciones vinculantes, investigaciones y/o transferencia en laboratorios, industrias, plantas fabriles u otros pertinentes al efecto.

http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload_editores/u294/GBC_Vinculacion_2018.pdf

PLAN QUINQUENAL 2015-2019

Misión

Aportar a la sociedad profesionales con espíritu científico, en las áreas de Medicina Veterinaria y Producción Animal, capaces de investigar, crear y adaptar tecnologías que se requieren en los procesos de desarrollo del país, con una conciencia de conservación, protección y mejoramiento del medio ambiente y del uso racional de los recursos naturales dentro de una cultura ecológica en beneficio de la salud humana.



LA **EDUCACIÓN** NO CAMBIA EL MUNDO:
CAMBIA A LAS PERSONAS QUE VAN
A CAMBIAR EL MUNDO.

PAULO FREIRE

