

Hol tayn Sı ırlarında Sı ır Lökosit Ba lanma Noksanlı ı (SLBN) ve Tanı Yöntemleri

Bilal AKYÜZ¹, Okan ERTU RUL²

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

Özet: Sı ır lökosit ba lanma noksanlı ı (SLBN), Hol tayn sı ırlarında görülen öldürücü, otosomal, çekinik, kalıtsal bir bozukluktur. Bozukluk, sı ır lökosit ba lanma glikoproteininin CD18 alt ünitesini kodlayan gende meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkar. Hasta hayvanlarda tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar ve hemen tamamı nötrofil lökosit olan devamlı bir lökosit artı ı göstermesi dışında SLBN'da özel klinik belirtiler yoktur. Hol tayn populasyonlarında hastalık genini tamamen ortadan kaldırmak için taşıyıcıların belirlenmesi çok önemlidir. Bu derleme SLBN ve bu kalıtsal bozuklu un tanı yöntemleri hakkında bilgiler içermektedir.

Anahtar Kelimeler: CD18, Hol tayn, nötrofil, SLBN

Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein Cattle and Detection Methods

Summary: Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) is a lethal, autosomal, recessive and inherited disorder of Holstein cattle. This disorder emerges as a result of a point mutation on the gene encoding bovine leukocyte adhesion glycoprotein subunit CD18. Other than recurrent mucosal infections and persistent increased numbers of mainly neutrophil leukocyte, there is no specific clinical symptom in BLAD. Detection of animals affected with this disorder among Holstein is very important to remove the gene encoding BLAD. This review article addresses the general information including detection methods of hereditary disease of BLAD.

Keywords: BLAD, CD18, Holstein, neutrophil

Giri

Sı ır lökosit ba lanma noksanlı ı (SLBN), Hol taynlarda görülen ve hasta hayvanların yaşamalarının ilk yıllarında ölmelerine neden olan otosomal, çekinik, kalıtsal bir bozukluktur (20, 21). Bozukluk, sı ır karyotipinin bir numaralı kromozomundaki CD18 geninde olu an bir nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkar (13). Benzer semptomlarla seyreden bozukluklara insanlar ve rlanda Seter köpeklerinde de rastlanılmaktadır (4, 10).

Lökositlerin, yangı durumunda damar duvarını geçerek yangı bölgesine ulaşmaları; hücre zarlarında bulunan ve olarak adlandırılan iki alt üniteden olu an, lökointegrin reseptörler sayesinde olur (4, 8, 18). Lökointegrin kompleksinde olu akan bir bozukluk, lökositlerin damar duvarına çıkamayıp lezyonlu dokuya ulaşmalarını engeller (1, 7). Bozukluk, ilk olarak 1990 yılında ABD'de belirlenmi ve sı ır granülopati sendromu olarak adlandırılmıştır (9).

Bozuklu a Sebep Olan Mutasyon

Bozukluk, Hol taynlarda CD11/CD18 kompleksinin CD18 alt ünitesini kodlayan genin, 383. nükleoti-

dinde "guanin adenin" de i ikline neden olan bir nokta mutasyonu sonucu olu ur. Bu de i iklik CD18'i olu turan amino asit sırasınının 128. amino asit olan aspartik asit yerine glisin gelmesine neden olur. Mutant allel D128G, normal allel ise CD18 olarak gösterilir (8).

Bozuklu un Klinik Belirtileri

Hasta buza ıların sindirim kanalında, a ız mukozasında geni ve yaygın ülser, di etlerinde di eti iltihabı ve erken di kaybı, iddetli ve iyilemeyen bir ishal, solunum sistemlerinde bron it ve pnemoni görülür. Hasta buza ılar antibiyotik sa altımına yanıt vermezler (1, 5). Uygulanan tedavi sonrasında klinik belirtiler ortadan kalksa bile, tedavi bitimini takiben kısa sürede klinik görünümü tekrarlar (4, 6, 8, 20).

Hasta buza ılarda aralıklarla yapılan kan sayımında hemen tamamı nötrofil lökosit olan devamlı bir lökosit artı ı görülür (5). Sa lıklı bir sı ırın 1 mm³ kanında 8 000 adet lökosit sayılırken (18), hasta buza ılarda bu sayı 100 000'den fazladır (17). Hasta buza ılarda büyüme gerili i ve a ırı zayıflık görülür. Hasta buza ıların vücut a ırlıkları ya ıtalarının ancak %50-60'ı kadardır (8). Histolojik incelemede, kan damarlarının içinde bol miktarda nötrofil lökosit görülürken lezyonlu mukoza yüzeyinde nötrofil lökosit hiç yoktur ya da çok azdır. Otopside

solunum ve sindirim sistemlerinin mukozalarında yaygın ülserli ve gangrenöz lezyonlar, dalak büyümesi ve ya dokuda azalma görülür (17). Hastalının prognozu kötüdür, hasta buza ılar do umu takip eden ilk birkaç hafta içinde ölür. Enfeksiyonların yaygın ı ve etkilenen organların etkilenme derecesine ba lı olarak ölüm bir ya ına kadar ertelenebilir (5).

Hasta ve Ta ıyıcıların Belirlenmesi

Hastalının yayılmasında herhangi bir klinik belirti göstermeden ya amlarını normal sürdüren ancak sahip oldukları mutant alleli yavrularına geçirme olasılıkları %50 olan ta ıyıcılar çok önemlidir. Bu nedenle ta ıyıcıların belirlenmesi gereklidir. Ta ıyıcıların belirlenmesi amacıyla üç yöntem kullanılır.

1. Pedigri analizi: Yöntem bir hayvanın kalıtsal bozuklu a sebep olan çekinik alleli ta ıyıp ta ıma dının belirlenmesine yardım edebilir. ABD'deki hasta buza ıların geriye do ru be jenerasyon akrabaları incelendi inde, hepsinin 1952'de do an Osbornale Ivanhoe isimli bo a ile akraba oldukları görülmü tür (7, 9). Aynı ekilde Japonya ve Avrupa'daki hasta buza ıların pedigrileri incelendi inde en sonunda Osbornale Ivanhoe'ye ula ıldı. Gerek bu bo a gerekse o ıllarının damızlıkta yaygın kullanımı sonucu SLBN tüm dünyaya yayıldı. Hastalının bir ülkeden di erine yayılmasında ta ıyıcı bir bo a yeterlidir. Örnek olarak, SLBN'nin Danimarka'da yayılmasının ba lıca sorumlusu NJY Huber isimli bo adıdır. Danimarka'da bu bo anın 1991 yılında do an tüm yavrularının % 17'si hasta oldu u görülmü tür. Bu bo anın 1991 yılında spermaları kullanılarak yapılan 1183 tohumlamanın 820 sinin "ta ıyıcı x ta ıyıcı" birleşimi oldu u belirlenmiştir (4). SLBN ta ıyıcısı oldu u bilinen bo alarla akrabalıkları olan bo a ve ineklerin ta ıyıcı olma olasılıkları yüksektir.

2. Biyokimyasal tanı: Biyokimyasal olarak bir kalıtsal bozuklu un belirlenebilmesi için, bozuklu un bir protein eksikli ine neden olması ve bu eksikli inde, kan ve di er dokulardan uygun bir laboratuvar testi ile belirlenebilmesi gereklidir. Biyokimyasal yöntem ile sadece hasta ve sa lıklı bireyler belirlenir. Kalıtsal bozuklukların yayılmasında önemli etken olan ta ıyıcılar belirlenemez. SLBN'nin biyokimyasal olarak tanısı CD18 glikoproteini bulunduran lökositleri sayan ve bunları yo unluk olarak gösteren "Flow Sitometri" cihazı ile yapılır (21).

3. Moleküler tanı: Kalıtsal bozuklu un genetik temelini aydınlatılmasından sonra geli tirilen ve DNA kullanılarak yapılan testler, hasta, normal ve

ta ıyıcı hayvanların belirlenmesine olanak sa lar. Moleküler tanı yöntemleri, klasik tanı yöntemleriyle kar ıla tırıldı ında daha do ru, daha ucuz ve daha hızlı sonuç vermeleri nedeniyle kalıtsal bozuklukların belirlenmesinde en yaygın kullanılan testlerdir. Moleküler tanı ile sadece canlı bireyler de il embriyo ve sperma da incelenebilir. Bu da iki ekilde yapılır.

A. Polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) takiben yapılan restriksiyon parçacık büyüklük polimorfizmi: Lökointegrini kodlayan genin genetik kodu 1992'de çözülmü tür. Bu genetik kod kullanılarak mutant ve normal CD18 genleri için primerler üretilmi ve SLBN'nin belirlenmesi için yapılan PZR'de kullanılmaya ba lanıldı (7).

Yöntem, PZR ürünlerinin *TaqI* veya *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Bu amaçla ilk yöntem Shuster ve arkadaşları tarafından geli tirildi (19, 22). Bu yöntemde PZR ürünlerinin *HaeIII* ile kesilmesi sonucunda, normal buza ılarda 101, 24 ve 9 baz çifti uzunlu unda üç bant, hasta buza ılarda 82, 24, 19 ve 9 baz çifti uzunlu unda dört bant, ta ıyıcılarda ise 101, 82, 24, 19 ve 9 baz çifti uzunlu unda be bant elde edilir (13, 14, 20). Yöntem ba langıçta tüm dünyada SLBN tanısında yaygın kullanıldı. Ancak sonraları enzim ile kesilme sonucunda elde edilen bantların küçük olması ve hatalı tanıya neden olabilmesi nedeniyle farklı yöntemler geli tirildi (11, 14, 15).

B. Ligaz zincir reaksiyonu (LZR): Yöntem, sadece bilinen gendeki tek bir baz de i ikli ine neden olan nokta mutasyonunu belirlemek için PZR ile birlikte kullanılır. Yöntem, birisi mutant allele, di eri ise normal allele uygun, be üstü uçları biotin ile i aretli sentetik oligo nükleotidler kullanılarak yapılır. Bu primerler, termostabil bir ligaz enzimi sayesinde, incelenen üpheli DNA'da kendilerine uygun bölgelere ba lanırlar. Tanı, i aretli primerlerin üpheli DNA'ya ba lanıp ba lanamamasına göre yapılır. Ba lanmanın olup olmadığını görüntülemek için streptavidin boyası ile kaplanmış mikropleyt kuyucukları kullanılır. Biotin ve streptavidinin birleşimi ile olu an mavi rengin görülmesi, primer ile üpheli DNA'nın birleşimi oldu unu gösterir. Normal CD18 alleli için hazırlanan primer ile birleşerek renk veren örnek homozigot normal, mutant D128G alleli için hazırlanan primer ile birleşerek renk veren örnek homozigot hasta olarak değerlendirilir. Hem CD18 hem de D128G alleli için hazırlanan primerlerle birleşerek renk veren üpheli DNA'lar ise heterozigot olarak değerlendirilir (3).

Sonuç

Sadece Hol tayn sı ırlarında görülen kalıtsal immun bozukluk olan SLBN süt endüstrisini tehdit eden en önemli kalıtsal hastalıktır. Hastalı ın ilk ortaya çıktığı ABD'de hastalık için eradikasyon programı başlatılana kadar her yıl SLBN'li buza ırların ölmesi sonucu kar ıla ılan ekonomik kaybın 5 milyon dolar oldu u tahmin edilmiştir (4). Bu durum, do umu takip eden kısa sürede ölen buza ırların kaybı sonucu kar ıla ılan ekonomik kayıptır. Bir yıla kadar ya ayan buza ırlarda kullanılan ilaç ve veteriner hekim hizmetleri de dü ünüldü ünde ekonomik kaybın daha da büyük oldu u dü ünülebilir. Türkiye'de ekonomik kaybın hesaplanmasında saf Hol taynlar yanında Hol tayn melezlerinde SLBN nedeniyle oluşabilecek ekonomik kayıp da dikkate alınmalıdır.

Bir Hol tayn buza ısında irinli di eti yangısı, büyüme gerili i, sık tekrarlayan ishal ve antibiyotik tedavisine cevap vermeyen bakteriyel enfeksiyonlarla kar ıla ıldı ında yeti tiriciler ve klinik veteriner hekimlerin aklına SLBN de gelmelidir.

Dünyadaki bir çok ülkede SLBN vakalarına rastlanılmaktadır. İlk kez ABD'de ortaya çıkmasına rağmen, üstün verim özelliklerine sahip hayvanların ABD dışındaki ülkelerde de genetik materyal olarak kullanılması sonucunda bozukluk, Almanya, Danimarka, Hindistan, Hollanda, Japonya, Kanada, Yeni Zelanda, Avustralya ve Rusya'ya yayılmıştır (4, 12, 16). Hastalı a neden olan mutant alleli Hol tayn popülasyonunda varlığını belirleyen her ülke kendi Hol tayn popülasyonunda eradikasyon programı başlatmıştır. Ayrıca ithal edilen damızlık hayvan, sperma ve embriyolarda bu kalıtsal bozuklu u taşıdığı ının belgelenmesi istenmektedir. Türkiye'deki Hol tayn popülasyonu içinde SLBN taşıyıcısı damızlık bir bo a saptanmıştır (2). Ancak Türkiye'de bu ve di er kalıtsal hastalıklar için bir tanı ve eradikasyon programı henüz yoktur.

Kaynaklar

- 1- Ackermann MR, Brogden KA, Florance AF, Kehrlı M, 1999. Induction of CD18-mediated passage of neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in pulmonary bronchi and bronchioles. *Infect Immun*, 67: 659-663.
- 2- Akyüz B, 2004. Türkiye'deki Hol tayn sı ırlarında sı ır lökosit başlanma yetmezli inin (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ile belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Ün Sa lık Bil Enst, Zootekni Programı. Ankara.

- 3- Batt CA, Wagner P, Wiedmann M, Luo J, Gilbert R, 1994. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency by nonisotopic ligase chain reaction. *Anim Genet*, 25: 95-98.
- 4- Fésüs L, Zsolnai A, Anton I, Bárány I, Bozó S, 1999. BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holsteins. *J Anim Breed Genet*, 116: 169-174.
- 5- Healy PJ, 1992. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD)-another genetic defect of Holstein/Friesians. *Aust Vet J*, 69: 190.
- 6- Jánosa Á, Baranyai B, Dohy J, 1999. Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary. *Acta Vet Hung*, 47: 283-289.
- 7- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Fifth Edition. London: Academic Press, pp. 36-37.
- 8- Kehrlı MK, Ackermann MR, Shuster DE, Van Der Maaten MJ, Schmalstieg FC, Anderson DC, Hughes BJ, 1992. Animal model of human disease, bovine leukocyte adhesion deficiency, α_2 integrin deficiency in young Holstein cattle. *Am J Pathol*, 1406: 1489-1492.
- 9- Kehrlı M, Shuster DE, Ackerman MR, 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet*, 82: 103-9.
- 10- Kijias JMH, Bauer TR, Gafvert S, Markund S, Trowald-Wigh G, Johannisson A, Hedhammar A, Binns M, Juneja RK, Hickstein DD, Anderson L, 1999. A missense mutation in the b-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics*, 61: 101-107.
- 11- Kriegesmann B, Jansen S, Baumgartner BG, Brenig B, 1997. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *J Dairy Sci*, 80: 2547-2549.
- 12- Marzanov NS, Eskin GV, Popov AN, Zinovieva NA, Ignatiev VM, Brem G, 2000. The frequency of gene BLAD-syndrome at black and white genealogical root of cattle of Russian Federation. Book of abstracts of the fifty first annual meeting of the European Association to Animal Production. Abstracts No.19, The Hague, The Netherlands August, 21-24 Wageningen Pres. p. 11.

- 13- Millar P, Lauvergne JJ, Dolling C, 2000. *Mendelian Inheritance in Cattle*. The Netherlands, Wageningen: Wageningen Pres, pp. 351-352.
- 14- Mirck MH, Von Bannisseht-Wijsmuller TH, Timmermans-Besselink WJH, Van Luijk JHL, Buntjer JB, Lenstra JA, 1995. Optimization of the PCR test for the mutation causing bovine leukocyte adhesion deficiency. *Cell Mol Biol*, 41: 695-698.
- 15- Mukhopadhyaya PN, Mehta HH, Rathod RN, 2000. A methods for PCR-RFLP screening of a genetic disease in dairy cattle. *Mol Cell Probes*, 14: 381-384.
- 16- Muraleedharan P, Khoda V, Sven G, Mukhapadhyaya PN, Manfred S, Mehta HK, 1999. Incidence of hereditary citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalus*) population. *Arch Tierz*, 42: 347-352.
- 17- Olchowoy TWJ, Bochsler PN, Welborn MG, 1994. Clinopathological findings in a Holstein calf with peripheral leukocytosis and leukocyte adhesion deficiency. *Can Vet J*, 35: 242-243.
- 18- Sa lam M, A ti RN, Özer A, 1997. *Genel Histoloji Ders Kitabı*. Be inci Baskı. Ankara: Yorum Matbaacılık Sanayi, s. 220-222.
- 19- Shuster DE, Kehrlı M, Ackermann MR, Gilbert R, 1992. Identification and prevalance of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Nat Acad Sci USA*, 89: 9225-9229.
- 20- Spes KM, Edens HA, Kehrlı M, Miettinen HM, Cutler JE, Julita MA, Quinn MT, 1999. Analysis of surface antigen expression and host defence function in leukocytes from calves heterozygous or homozygous for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Am J Vet Res*, 60: 1255-1261.
- 21- Tammen I, Klippert H, Kuczka A, Treviranus A, Pohlenz J, Stöber M, Simon D, Harlizius B, 1996. An improved DNA test for bovine leucocyte adhesion deficiency. *Res Vet Sci*, 60: 218-221.
- 22- Zsolnai A, Fèsüs L, 1996. Simultaneous analysis of bovine K-casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. *Anim Genet*, 27: 207-209.

Yazı ma Adresi :

Dr. Bilal AKYÜZ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Zootečni ABD
Barı Manço C. Sümer M.38090
Kocasinan, Kayseri,
Tel: 0-352-3380005/1205
Fax: 0-352-3372740
E-Mail: bakyuz@erciyes.edu.tr