14(3) 73-78, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Evaluation of the presence of leukocyte adhesion deficiency (BLAD) disease in Holstein cows in Iranian sperm production stations

Zahra Namvar [1*], Khadijeh Boostan [2], Mohammad Hossein Nazem Shirazi [3]

[1] Biotechnology Laboratory, Animal Breeding Center and Production Improvement, Deputy of Livestock Production Affairs, Karaj, Iran
[2] Chalous Agricultural Jahad Management, Mazandaran Agricultural Jahad Organization, Chalous, Iran
[3] Veterinary doctor and international laboratory expert in the World Bank project, FAO project, Iran

Key Words
BLAD
Gene
Holstein

Abstract

Introduction: One of the problems of sperm production stations and breeding centers is the death of calves that do not reach the stage of sperm production and economic useful life. Various cases can be involved in this. Bulls that are used in artificial insemination despite Natural appearance may have mutated genes that, due to their unrecognized and distributed sperm, cause the spread of various genetic defects. One of these genetic defects is BLAD, an autosomal recessive genetic disease caused by a defect in the surface glycoproteins of leukocytes known as integrins. These proteins are responsible for the cell-cell binding reaction that is required for neutrophils to attach to the endothelial network and enter tissues and repel pathogen attacks. They disappear before the age of one. So far, the disease has been seen in Holstein cows. If two recessive genes intersect, one in a male and the other in a female, 25% of the offspring become homozygous. The use of bull sperm in artificial insemination centers (AI) as well as in embryo transfer increases the risk of such diseases, so it is necessary to check the sperm and embryos before use in these centers. The aim of this study was to identify the carriers of these genes to prevent them from crossing and to prevent the spread of this disease.

Materials & Methods: In this study, in order to identify the presence of BLAD disease gene in some bulls in the country, the study of biological samples of 230 bulls in Iranian sperm production stations was evaluated .For this study, primers with lengths of 18 and 29 nucleotides were used to amplify the bp58 fragment and to investigate the presence of the mutant. After observing the 58 bp fragment for the presence or absence of mutations in the PCR product, TaqI and HaeIII enzymes were used by RFLP method.

Results: By examining this number of samples, 225 normal homozygous animals and 5 heterozygous animals were identified.

Conclusion: With careful planning and control and identification of mutated alleles, it is possible to eliminate this disease in Iran.

* Corresponding Author's email: zahranamvar@gmail.com
Received: 22 June 2021; Reviewed: 31 July 2021; Revised: 3 October 2021; Accepted: 25 October 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.304768.2635

مقاله پژوهشی

بررسی وجود ژن بیماری نقص در چسبندگی لوکوسیت‌ها (BLAD) درگاوهای هلشتاین موجود درایستگاه‌های تولید اسپرم ایران

زهرا نامور[۱]، خدیجه بوستان[۲]، محمدحسین ناظم‌شیرازی[۳]*

[۱] *آزمایشگاه بیوتکنولوژی، مرکز اصلاح نژاد دام و بهبود تولیدات دامی، معاونت امور تولیدات دامی، کرج، ایران*

[۲] *مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان چالوس، سازمان جهاد کشاورزی استان مازندران، چالوس، ایران*

[۳] *دکترای دامپزشکی و متخصص بین‌المللی آزمایشگاه در پروژه بانک جهانی، پروژه فائو، ایران*

کلمات کلیدی

BLAD
ژن
هلشتاین

چکیده

مقدمه: یکی از مشکلات ایستگاه‌های تولید اسپرم و مراکز پرواری، مرگ گوساله‌هایی می‌باشد که به مراحل تولید اسپرم و عمر مفید اقتصادی نمی‌رسند. ازجمله این نقص‌های ژنتیکی می‌توان BLAD را که یک بیماری‌ژنتیکی مغلوب اتوزومی است نام برد که به‌علت نقص در گلیکوپروتئین‌های سطحی لوکوسیت‌ها که تحت عنوان اینتگرین‌ها شناخته می‌شوند، ایجاد می‌گردد. تاکنون این بیماری در گاوهای نژاد هلشتاین دیده شده است. در صورت تلاقی دو ژن مغلوب یکی از حیوان نر و دیگری از ماده منجر به هموزیگوت شدن ۲۵٪ فرزندان می‌شود. استفاده از اسپرم گاوهای نر در مراکز تلقیح مصنوعی (AI2) ونیز درانتقال جنین، احتمال شیوع چنین بیماری‌هایی را بالا می‌برد، هدف از این مطالعه شناسایی ناقلین این ژن‌ها بوده تا از تلاقی و شیوع این بیماری جلوگیری شود.

مواد و روش‌ها: در این بررسی جهت شناسایی بیماری BLAD در بخشی از گاوهای نر موجود در کشور، مطالعه نمونه‌های بیولوژیک ۲۳۰ راس گاو نر موجود در ایستگاه‌های تولید اسپرم ایران مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام این مطالعه از پرایمرهایی به طول ۱۸ و ۲۹ نوکلئوتید جهت تکثیر قطعه bp58 و بررسی وجود موتان مورد نظر استفاده گردید و پس از مشاهده قطعه bp58 برای وجود یا عدم وجود موتاسیون در محصول PCR از آنزیم‌های TaqI و HaeIII به‌روش RFLP به‌کار گرفته شد.

نتایج: با بررسی این تعداد نمونه، تعداد ۲۲۵ راس حیوان نرمال هموزیگوت و ۵ راس حیوان هتروزیگوت شناسایی گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با برنامه‌ریزی و کنترل دقیق و شناسایی الل‌های جهش یافته، می‌توان نسبت به حذف این بیماری در ایران اقدام نمود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: zahranamvar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۹ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۱ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۳ آبان ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.304768.2635

مقدمه

اگرچه بیماری‌های عفونی و عوارض آن سالیان زیادی است که شناسایی شده‌اند مانند ورم پستان که سبب تحمیل هزینه‌های درمانی می‌گردد (۱). اما از بیماری‌های ژنتیکی نیز نباید غافل گردید. BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) ابتدا در گله Holestein Friesian در اوائل دهه ۸۰ میلادی تشخیص داده شد اما در مورد نژادهای دیگر هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است. آنالیز شجره و تست DNA تعیین می‌کند که نقص ژنتیکی احتمالاً از یک جد تنها نشات می‌گیرد و به گاو نر Carlin m ivanhoe-bell منتهی می‌شود، البته از پسر و نوه پسری این گاو Penstate-ivanhoe star و Osbornadale ivanhoe، نیز در مراکز AI (Artificial Insemination) استفاده شده است. Osbornadale ivanhoe در دهه‌های ۱۹۵۰و ۱۹۶۰ علی‌رغم ناقل بودن به‌علت تولید شیر و ارزش ژنتیکی بالا به‌عنوان پدر در AI استفاده می‌شده است (۲). Shuster و همکاران، نشان دادند که علت این بیماری جهش در ژن CD18 است و این بیماری تک لوکوسی می‌باشد (۳). بررسی آنان به‌روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction -Restriction fragment length polymorphism) انجام شده بود (۴). گله‌های مبتلا به BLAD به‌شدت و به‌طور برگشت‌پذیر قابلیت ابتلا به عفونت‌های باکتریایی همانند پنومونی، ژنژویت (ورم لثه-دندان)، آبسه، تاخیر در بهبود زخم‌ها، کاهش و عقب ماندگی رشد، عفونت‌های مزمن و نوتروفیلیا را دارا هستند (۲، ۵). نمونه خون این گاوها افزایش بیش از حد لوکوسیت‌ها (۱۰۰۰۰۰ لوکوسیت در لیتر) را نشان می‌دهد (۶). با بررسی در گاوهای مبتلا مشخص گردید که در اطراف عروق و فضای داخل سلولی رسوب آمیلوئید دیده می‌شود که این رسوب با IgG واکنش می‌دهد، چرا که در این مبتلایان Igها و به‌خصوص گاماگلوبولین‌ها افزایش می‌یابد (۷). ژن (CD18) روی کروموزوم شماره یک گاو قرار دارد. دو موتاسیون نقطه‌ای در ژن کد کننده CD18 در گاوهای هلشتاین تشخیص داده شده است که با BLAD ارتباط دارند. در یک جهش آدنین با گوانین در نوکلئوتید ۳۸۳ جا به‌جا می‌شود و در دیگری سیتوزین با تیمین در نوکلئوتید ۷۷۵ جابجا می‌شود. جهش دوم یک موتاسیون خاموش است چرا که هیچ تغییری در توالی اسیدآمینه ایجاد نمی‌شود و در نتیجه روی فنوتیپ اثر نمی‌گذارد (۸). جهش در نوکلئوتید ۳۸۳، اسیدآسپارتیک را به‌جای گلایسین در اسیدامینه ۱۲۸ ذخیره می‌کند (D128G) که این جهش‌ها با آنزیم‌های هضم‌کننده Taq I و HaeIII تشخیص داده می‌شوند، با این آنزیم‌ها موتان‌ها، حاملین و نرمال‌ها را می‌توان شناسایی نمود. این جهش در زیر واحد β(CD18) اتفاق می‌افتد که از خانواده گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد و نتیجه آن محدودیت بیان مولکول‌های اتصالی β2 اینتگرین روی سطح لوکوسیت‌ها می‌باشد (۲).

فقدان مولکول‌های اتصالی مانع اتصال لوکوسیت‌ها و عبور از سیستم عروقی به محل عفونت می‌گردد، لذا مهاجرت لوکوسیت‌ها جهت فاگوسیتوز با مشکل روبرو می‌شود. این بیماری بسیار شبیه به بیماری LAD (Leukocyte Adhesion Deficiency) در انسان است، بنابراین گاو می‌تواند مدل حیوانی مفیدی برای عملکرد اینتگرین β2 و بیماری LAD باشد (۳). در افراد سالم وقتی یک عفونت در بدن توسعه یابد لوکوسیت‌ها شروع به حرکت کرده و با چسبیدن به پایه‌های ریز CD18 و دیواره رگ‌های خونی شبیه قلاب به آرامی می‌خزند و به سمت عفونت مهاجرت می‌کنند که شامل بخشی از پاسخ ایمنی اولیه است (۹). نقص چسبندگی لوکوسیت‌ها، یک بیماری اتو ایمنی و نقص سیستم ایمنی اولیه PI (Primary immunity) است و مسری نیست و این نقص در سیستم ایمنی به‌میزان ویژه‌ای شامل افزایش سطح سوپر اکسیداز در خون و یا افزایش سطح سیتوکین‌های قبل از التهاب است که ممکن است نقش اصلی در این بیماری داشته باشد. این سندرم خودش را به‌طور افزایش التهاب در ماهیچه‌ها، تاندن‌ها و اتصالات نشان می‌هد. اینتگرین‌ها اتصالات سلولی اولیه هستند که توسط لوکوسیت‌ها بیان می‌شوند. بیان اینتگرین‌ها به ارتباط داخل سلولی هم زیر واحد CD18 و هم CD11 احتیاج دارد. زیر واحد β2 اینتگرین دارای ۵ اگزون می‌باشد که موتاسیون نقطه‌ای BLAD در اگزون ۵ و CLAD (همین بیماری در سگ‌ها) در اگزون ۳ قرار دارد. لازم به یادآوری است که این بیماری در نژادهای Irish Red و White setten سگ‌ها نیز مشاهده شده که تحت عنوان CLAD معرفی می‌گردد و در آن نیز نقص در زیر واحد β2 هتروداپمر پروتئین‌های اتصالی لوکوسیت‌ها است. این جهش در موقعیت ۱۰۷bp رخ می‌دهد (۱۰)، البته یادآوری این نکته نیز ضروری است که چند سال پیش نیز این بیماری در شترها هم دیده شد (۱۱). اینتگرین‌ها از پروتئین‌های ترانس ممبرانی هستند (۱۲). نقص CD18 مانع فعالیت تمام اینتگرین‌ها می‌شود (۸). تا قبل از پیشرفت بیولوژی مولکولی و استفاده از آن در تکنیک‌های پیشرفته جهت بررسی انواع ژن‌ها، بیماری‌ها، درمان و جهت انتخاب دام‌های برتر در علوم دامی از آنالیزهای آماری و اصلاح نژادی بر طبق صفات تولیدی و ارزیابی خصوصیت فنوتیپی دام‌ها استفاده می‌شده است و در این بررسی‌ها از علم ژنتیک کلاسیک برای یافتن ویژگی‌های غالب و خوب استفاده می‌شده است با گسترش تکنیک‌های آزمایشگاهی و شناسایی به موقع بسیاری از بیماری‌ها و عوامل آن‌ها می‌توان از بروز چنین خساراتی جلوگیری به عمل آورد، اگرچه امروزه از تکنیک توالی نسل بعد نیز برای رمزگشایی و نیز شناسایی انواع تغییر نوکلئوتیدها و جایگاه وقوع آن‌ها استفاده می‌شود (۱۳).

مواد و روش‌ها

جهت این بررسی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز اصلاح نژاد دام و بهبود تولیدات دامی بر روی نمونه‌های اسپرم خام، منجمد و خون با روش PCR_ RFLP کار شده است.

تهیه نمونه‌های اسپرم و خون جهت بررسی: نمونه اسپرم خام و منجمد و نمونه خون از گاوهای نر ایستگاه‌های تولید اسپرم تهیه شد. نمونه‌های اسپرم خام در مجاورت یخ و نمونه‌های اسپرم منجمد به‌صورت پایت درون تانک ازت و نمونه‌های خون به‌صورت هپارینه به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی DNA: DNA تمام نمونه‌ها را با استفاده از کیت کمپانی Roche (High pure PCR Template preparation kit) و به‌روش فیلتر ستونی استخراج نمود. سپس از آگارز با غلظت ۲٪ جهت Gel monitoring استفاده کرده و هم‌چنین از دستگاه اسپکتروفوتومتر Nano drop جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده استفاده گردید.

انجام PCR: جهت این کار از DNA استخراج شده از ژنوم و پرایمرهای سفارش داده شده مطابق منبع (از شرکت MWG) استفاده شد (۲) و توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از:

Forward: 5´ CCG GAG GGC CAA GGG CTA3´
Reverse: 5´GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTGTACAGG 3´

برای انجام PCR، از کیت Hot star-Taq master mix شرکت کیاژن استفاده شد که جهت انجام آزمایش به‌ازاء هر نمونه ۱۰ میکرو لیتر بافر، یک میکرولیتر آب،۲ میکرولیتر محلول رنگی Coral، و از هر کدام از پرایمرهای forward و reverse یک میکرو لیتر و از نمونه DNA، ۵ میکرولیتر استفاده شد. تکثیر این قطعه از ژن مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر کمپانی corbet مدل CG1-96 انجام شد و برنامه حرارتی مورد نیاز جهت این امر به‌شرح زیر می‌باشد: ابتدا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌کار گرفته شد، سپس جهت تکثیر (دمای دناتوراسیون، c° ۹۵ به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش c°۷۲ به‌مدت ۶۰ ثانیه که این مراحل تکثیر طی ۳۵ سیکل انجام شد و سپس به مدت ۵ دقیقه دمای c° ۷۲ استفاده شد. سپس جهت رویت قطعه ۵۸bp، محصول PCR را بر روی ژل آگارز ۲٪ برده و پس از مشاهده باند مورد نظر به هضم آنزیمی آن اقدام گردید.

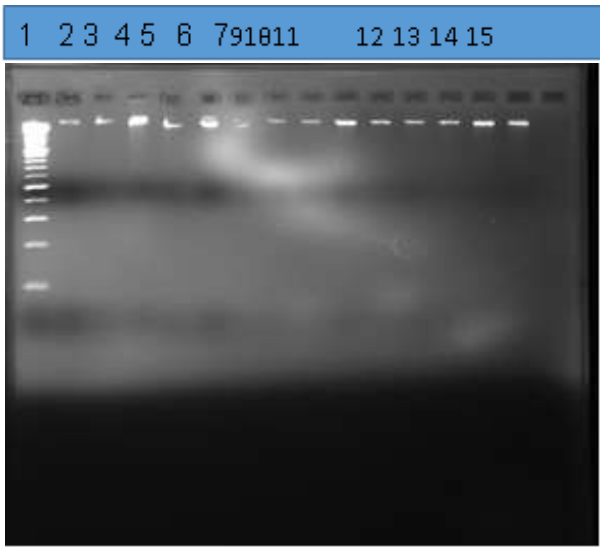
هضم آنزیمی: محصول PCR را تحت اثر آنزیم‌های TaqI و HaeIII (کمپانی Fermentas) قرارداده تا هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها از یکدیگر باز شناخته شوند. آنزیم Taq I در حیوانات هموزیگوت نرمال محصول PCR را به دو قطعه bp ۲۶ و ۳۲ و در حیوانات هتروزیگوت به سه قطعه bp ۵۸،۲۶،۳۲ تقسیم کرده و آنزیم HaeIII محصول PCR را در هموزیگوت‌های نرمال به دو قطعه bp ۹و ۴۹ و در هتروزیگوت‌ها به چهار قطعه bp ۹، ۱۹، ۳۰ و ۴۹ تبدیل می‌کند (۲). آنزیم TaqI توالی ´3AGC!T5´ و ´5T!CGA3´، آنزیم HaeIII توالی ´3CC!GG5´و ´5GG!CC3´ را می‌شکنند. جهت هضم آنزیمی، محصول PCR ۱۰ میکرولیتر، آب ۷ میکرولیتر، بافر ۲ میکرولیتر استفاده شد. از هر کدام از این دو آنزیم یک میکرولیتر استفاده شد. سپس نمونه‌ها را جهت فعالیت آنزیم Taq I در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و جهت آنزیم HaeIII در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار دادیم، محصولات هضم شده را روی ژل آگارز ۳ درصد برده تا باندهای حاصل از اثر آنزیم بررسی شود.

یادآوری: در تمام مراحل آزمایش از آگارز Top vision ساخت کمپانی Fermentas و هم‌چنین جهت رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم برماید به مقدار ۱٪ استفاده گردید.

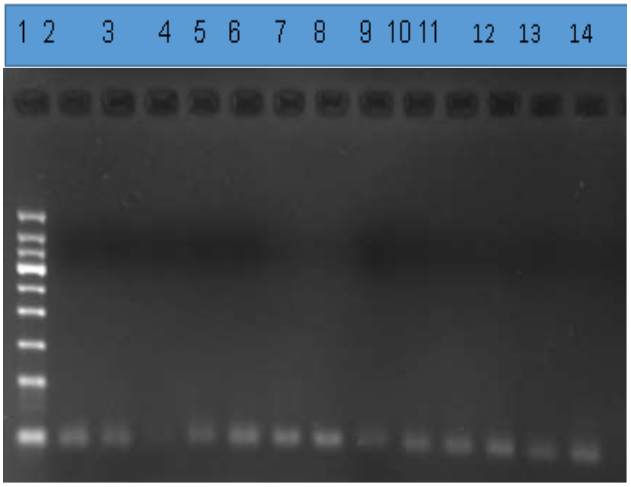
آنالیز نرم‌افزاری: نتایج در نرم‌افزار اکسل وارد گردید و آنالیز شد.

نتایج

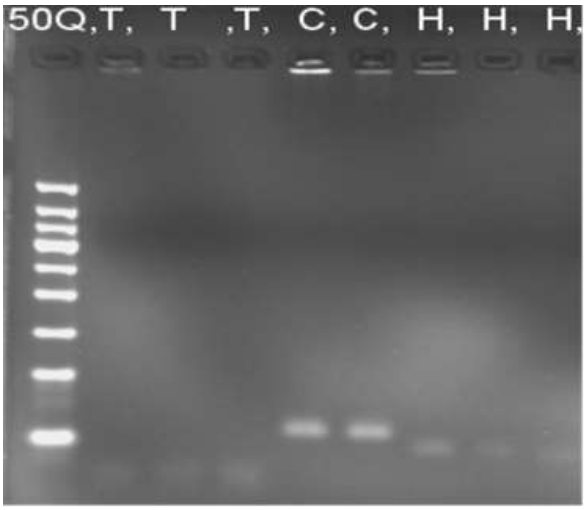
با بررسی ۲۳۰ اسپرم خام ، منجمد و خون گاوهای موجود در ایستگاه‌های تولید اسپرم، تعداد ۵ راس دام ناقل و ۲۲۵ راس دام سالم شناسایی شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). با این بررسی قریب به ۲/۵ درصد از گاوها ناقل این ژن بودند (شکل ۴). بر این اساس درصد aa هموزیگوت مغلوب ۰٪، درصد Aa هتروزیگوت ۲/۲٪ و درصد هموزیگوت غالب AA، ۹۷/۷٪ به‌دست آمد.



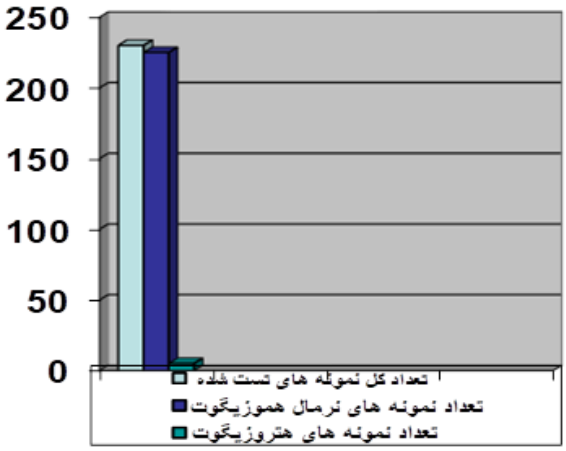
شکل ۱: DNA استخراج شده- ستون ۱: سایز مارکر-ستون‌های DNA:۲-۳-۴-۵-۶-۷-۸-۹-۱۰-۱۱-۱۲



شکل ۲: محصول PCR-ستون ۱:سایز مارکر-ستون‌های ۱۲-۱۱-۱۰-۹-۸-۷-۶-۵-۴-۳-۲:محصول PCR



شکل ۳: هضم محصول PCR باآنزیم
T = آنزیم H-Taq= آنزیم C–Hae III = کنترل



شکل ۴: نمودار تعداد هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها

بحث

از نظر BLAD می‌توان این‌گونه تحلیل کرد، گاوهای حامل ژن مغلوب این بیماری خود هیچ نوع علائم ظاهری را نشان نمی‌دهند اما اگر هر دو والدین حامل این ژن باشند در صورت تلاقی این دو ژن مغلوب ممکن است ۲۵٪ گوساله‌ها سالم و۵۰٪ ناقل و ۲۵٪ بیمار گردند. در هر کشوری مرکز خاصی مسئولیت نظارت و کنترل بر چگونگی کمی و کیفی اسپرم‌های توزیع شده را برعهده دارد که در ایران نیز مرکز اصلاح نژاد دام و بهبود تولیدات دامی با انتخاب گوساله نر ممتاز جهت ایستگاه‌های تولید اسپرم، این عمل را انجام می‌دهد. در کشورهای صادرکننده اسپرم در صورت انجام تست BLAD در کاتالوگ‌ها از علامت اختصاری BL (جهت ناقلین) و TL (جهت نرمال‌ها) استفاده می‌شود. ما نیز در کشور خود باید چنین اقداماتی را انجام دهیم، زیرا در سالیان قبل که این موضوع بررسی نمی‌شده است ممکن است از این اسپرم‌ها در دامداری‌های مختلف استفاده شده و امروزه نتاج هتروزیگوت آن موجود باشند لذا علی‌رغم هزینه بالای تست مولکولی انجام آن به‌علت حساسیت و دقت آن لازم به‌نظر می‌رسد. بررسی‌ها بر روی نمونه‌های اسپرم و خون انجام شد. نمونه اسپرم از آن‌جا دارای اهمیت است که با بررسی بانک اسپرم می‌توان در مورد گاوهایی که عمر اقتصادی آن‌ها تمام شده یا به هر دلیلی حذف گردیده‌اند بررسی کرد و توزیع اسپرم آن‌ها را کنترل نمود. اما بررسی روی نمونه‌های خون از آن‌جا اهمیت دارد که تهیه آن سهل الوصول است و هم درمورد گوساله‌های تازه متولدشده می‌توان انجام داد، لذا هزینه‌های گزاف درمورد پروار کردن آن‌ها تا رسیدن به تولید اسپرم را انجام نمی‌دهیم و زودتر نتیجه می‌گیریم چرا که برای تهیه اسپرم چندین سال باید صبر کرد (۱۴). برای انجام این مطالعه از پرایمرهایی به طول ۱۸ و ۲۹ نوکلئوتید جهت تکثیر قطعه ۵۸ bp و بررسی وجود موتان مورد نظر استفاده گردید و پس از مشاهده قطعه ۵۸ bp برای وجود یا عدم وجود موتاسیون در محصول PCR از آنزیم‌های TaqI و HaeIII استفاده شد. محصول PCR را تحت اثر این دو آنزیم قرارداده تا هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را از یکدیگر باز شناسایی شوند. آنزیم Taq I محصول PCR را به دو قطعه ۲۶ bp و ۳۲ bp در حیوانات هموزیگوت نرمال و در حیوانات هتروزیگوت به سه قطعه ۵۸،۲۶،۳۲ bp تقسیم کرده و آنزیم HaeIII محصول PCR را در هموزیگوت‌های نرمال به دوقطعه ۹و۴۹ bp و در هتروزیگوت‌ها به چهار قطعه ۹و۱۹و۳۰و۴۹ bp تبدیل نمود. نکته قابل توجه آن که Marronو همکاران(۱۵)، Shusterو همکاران(۳)، Tajimaو همکاران(۱۶)، Batt و همکاران(۱۷)، Jorgensen و Madsen(۱۸) و Tammen و همکاران (۱۹) بر روی این بیماری کار کرده‌اند (۴). نتایج حاصل

با نتایج Meylan و همکاران (۲۰) و Takahashi و همکاران (۲۱) و Poli و همکاران (۲۲)(۳/۴٪) و Nagahata و همکاران (۲۳)(۸/۱٪) مشابه بوده (۲) و هم‌چنین Norouzy و همکاران، با بررسی گاوهای نر ایستگاه عباس‌آباد مشهد به شیوع ۳/۳٪ در نژاد هلشتاین دست یافتند همولوژی معنی‌داری را نشان داد. ضمن آن‌که Norouzy در نژاد براون سوییس موردی را یافت نکرد (۲۴). این نتایج با بررسی Shahin و همکاران، مشابه بود آن‌ها نیز هموزیگوت مغلوب یافت نکردند و در حدود ۲٪ ناقل شناسایی کردند (۲۵). در آمریکا تعداد ناقلین در سال ۱۹۸۸، ۲/۸ ٪ در مراکز AI بوده اما با بررسی و ارزیابی و Proof نمودن آن‌ها برای گاوهای نر این میزان در سال ۱۹۹۳ تقریباً حذف شده است و در سراسر دنیا کماکان بررسی‌ها روی اثر کمی BLAD بر صفات محصولات سلامت و تیپ به‌ویژه در گاوهای هتروزیگوت ادامه دارد. پیشنهاد می‌گردد که در مورد تمام دام‌ها اعم از گاوهای نر و نیز گاوهای ماده شیری در گله‌ها جهت جلوگیری از تلاقی و افزایش حاملین این ژن بررسی جامع صورت گیرد. علی‌رغم درصد کم ناقلین در دام‌های نر، لزوم شناسایی آن در دام‌های ماده نیز توصیه می‌گردد تا با شناسایی این ژن هزینه‌های نگه‌داری و بهداشتی دام‌ها را کاهش داد. لذا امید است با برنامه‌ریزی و کنترل دقیق و شناسایی الل‌های جهش یافته، این بیماری در ایران نیز حذف گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز اصلاح نژاد دام و بهبود تولیدات دامی که با فراهم‌نمودن آزمایشگاه بیوتکنولوژی امکان‌انجام این‌بررسی‌را فراهم نمودند.

منابع

1. **Safari, D., Hedayat Evrigh, N., SeyedSharifi, R., Shakouri, M.D., Vahedi, V. and Khalkhali Evrigh, R., 2021.** Identification of Single Nucleotide Polymorphism in Exon 3 of TLR4 Gene and its Association with Somatic Cell Count in Dairy Cattle. Journal of Animal Environment. 13(1): 47-52. (In Persian)
2. **Luciana, A., Riberio, E., Baron, E., Martinez, M. Lcoutinho, L., 2000.** PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. Genetics and Molecular Biology. 23(4): 831-834.
3. **Shuster, D.E., Kehrlijr, M.E., Ackermann, R. and Gilbert, R., 1992.** Deficiency Identification and prevalence Of A genetic defect that causes leukocyte adhesion in Holstein cattle. Agricultural sciences. 189: 9225-9229.
4. **Fesus, L., Zsolnai, A., Anton, I., Brany, I. and Bozo, S., 1999.** BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holsteins. Animal breeding and genetics. 116(I.2): 169-174.
5. **Nagahata, H., Nochi, H., Tamoto, K., Taniyama, H., Noda, H., Morita, M., Kanamaki, M. and Kociba, J., 1993.** Bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstin cattle. can J vet Res. 57(4): 255-261.
6. **Marcus, E. and Kehrli, Jr., 1992.** Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein cattle. The Cornell veterinarian. 82(2): 103-109.
7. **Taniyma, H., Yamamoto, S., Sako, T., Hirayama, K., Higuchi, H. and Nagahata, H., 2000.** Systemic KAL Amiloidosis Associated with bovine leukocyte adhesion. Vet. Pathol. 37: 98-100.
8. **Urszula, C., Tadeusz, Z., Marcin, G., Chandras, S. and Paree, K., 2004.** Silent point mutation polymorphism of the bovine CD18 endoing gene. J. App. Genet. 45(1): 73-76.
9. **Mahmoudi, M., Rezaei, A. and Farid Hosseini, R., 2021.** Cellular and molecular immunology. Abol, K.A., Andrew, H.L. and Shiv, P., Mashhad Academic Jihad Publications. 844 p. (In Persian)
10. **Foureman, P., Whiteley, M. and Giger, O., 1939.** Canine leukocyte Adhesion Defeciency: presence of the cy 36 ser ß-2 integrin mutation in an affected us Irishsetter cross-breed Dog and in us Irish Red and White setters. Journal of veterinary internal medicine. 16(5): 518-523.
11. **Davis, C.W. and Hamilton, M.J., 2006.** Use of flow cytometry to characterize immuno deficiency syndrome in camelids. Small ruminant research. 61(2-3): 187-193.
12. **Tarone, G.E., Brancaccom, H., De Acetis, M., Barberisl, B., Retta, F., Botta, S.F., Altrudaf, C. and Silengo, L., 2001.** Integrin function and regulation in development.int J Dev Biol. 45(5-6): 770.
13. **Hedayat Evrigh, N., Khalkhali Evrigh, R. and Seyed Sharifi, R., 2021.** Investigation of SNPs in genes related to lipid and glucose metabolism in the genome of dromedary, domestic Bactrian and wild Bactrian camels. Journal of Animal Environment. 13(2): 41-48. (In Persian)
14. **Rtncarz, E., Dietz, R.B., Marcus, A. and Kehrli, E., 1995.** Recognation of leukochimerism during genotyping for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) by polymerase-Chain-reaction-ampilified DNA extracted from blood. J vet Diagen invest .7: 569-572.
15. **Marron, B.M., Robinson, J.L. and Gentry, P.A., 2004.** Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. Anim Genet. 35(6): 454-456.
16. **Tajima, M., Irie, M., Kirisawa, R., Hagiwara, K., Kurosawa, T. and Takahashi, K., 1993.** The detection of a mutation of CD18 gene in bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). J. Vet. Med. Sci. 55: 145-146.
17. **Batt, C.A., Wagner, P. and Wiedmann, M., 1994.** Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency by nonisotopic ligase chain peaction. Anim Genet. 25: 95-98.
18. **Jorgensen, J.N. and Madsen, P., 1997.** Genetic parameters for and BLAD effects on beef production traits and diseases frequency. Acta Agric. Scand. A, Anim. Sci. 47: 1-8.
19. **Tammen, I., Klippert, H., Kuczka, A., Treviranus, A., Stoeber, M., Simon, D. and Harlizius, B., 1996.** An

improved DNA test for bovine leucocyte adhesion deficiency. Res. Vet. Sci. 60: 218-221.

20. **Meylan, M., Abegg, R.H., Sager, T.W. and Jungi, J., 1997.** Martig: Fallvorstellung: Bovine Leukozyten Adhasions Defizienz (BLAD) in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 139: 277-281.

21. **Takahashi, K., Miyagawa, K., Abe, S., Kurosawa, T., Sonoda, M., Nakade, T., Nagahata, H., Noda, H., Chihaya, Y. and Isogai, E., 1987.** Bovine granulocytopathy syndrome of Holstein Friesian calves and heifers. Jpn. J. Vet. Sci. 49: 733-736.

22. **Poli, M.A., Dewey, R., Semorile, L., Lozano, M.E., Albarino, C.G., Romanowski, V. and Grau, O., 1996.** PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle. Zentralbl Veterinaermed A. 43: 163-168.

23. **Nagahata, H., Miura, T., Tagaki, K., Ohtake, M., Noda, H., Yasuda, T. and Nioka, K., 1997.** Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. J. Vet. Med. Sci. 59: 233-238.

24. **Norouzy, A., Nassiry, M.R., Eftekhai shahrody, F., Javadmanesh, A., Mohammad Abadi, M.R. and Sulimova, G.E., 2005.** Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAd) carriers in Holstein and Brown swiss AI bulls in Iran. Genetika. 41: 1697-1701.

25. **Şahin, E., Karslı, T., Galiç, A. and Balcıoğlu, S., 2013.** Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and bovine citrullinaemia (BC) alleles in Holstein cows reared in Antalya region. Journal of Applied Animal Research. 41(1): 56-60.