

Wykorzystanie badań grup krwi w kontroli wiarygodności rodowodów bydła

Tadeusz Rychlik, Mariusz Kościelny

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Zlokalizowane na erytrocytach genetycznie warunkowane antygeny, zwane grupami krwi, stanowią zespół markerów genetycznych klasy pierwszej, które są szeroko wykorzystywane w badaniach, zarówno o charakterze poznawczym, jak i praktycznym.

Zootechniczna dokumentacja hodowlana, stanowiąca podstawę doboru zwierząt na rodziców następnych pokoleń, musi być zgodna ze stanem faktycznym, gdyż daje to gwarancję uzyskania postępu hodowlanego. W celu jej weryfikacji prowadzi się kontrolę rodowodów i identyfikację zwierząt w oparciu o badania wybranych markerów genetycznych krwi potomka i jego rodziców. Metoda ta jest obecnie powszechnie stosowana na świecie. Wykorzystanie do tego celu dużej liczby cech antygenowych, polimorficznych form białek krwi oraz w ostatnich latach polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA gwarantuje wiarygodny wynik.

Używana przez laboratorium w kontroli rodowodów bydła na podstawie badań grup krwi ilość i jakość reagentów testowych do oznaczania antygenów erytrocytarnych w istotny sposób wpływa na rzetelność uzyskiwanych rezultatów. Jakość reagentów testowych pochodzących z różnych laboratoriów świata weryfikowana jest w organizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (International Society for Animal Genetics – ISAG) międzynarodowych testach porównawczych. Zarówno weryfikacja jakości, jak i ujednoczenie nomenklatury reagentów stanowią o uniwersalności grup krwi przy ustalaniu testów genetycznych dla zwierząt hodowlanych. Testy te mogą być wykorzystywane w każdym państwie, co ma

szczególnie istotne znaczenie przy imporcie i eksporcie zwierząt, nasienia oraz transplontowanych zarodków.

Można przyjąć, że w efekcie prowadzonej kontroli gwarantowana jest wiarygodność danych, zawartych w dokumentacji hodowlanej dotyczącej pochodzenia. Rozwój badań nad grupami krwi u zwierząt przypada na lata 40. ubiegłego wieku, kiedy to zespół amerykańskich badaczy na Uniwersytecie Wisconsin rozpoczął badania nad różnicowaniem serologicznym u bydła. Dzięki pracom badawczym Fergusona, Irwina i Stormonta (Ferguson, 1941; Ferguson i in., 1942; Stormont i in., 1945) wykryto dużą liczbę cech antygenowych u bydła, a następnie u innych gatunków zwierząt.

Według danych ostatniego Międzynarodowego Testu Porównawczego u bydła (2003/2004) dotychczas zidentyfikowano ponad 100 erytrocytarnych antygenów, dziedziczących się w 12 układach grupowych krwi. Duże różnicowanie antygenowe erytrocytów stosunkowo szybko znalazło szerokie zastosowanie w praktyce hodowlanej. Miało to kolosalne znaczenie, zwłaszcza po wprowadzeniu sztucznej inseminacji w rozrodzie bydła, dającej możliwości szybkiego postępu hodowlanego.

W Polsce metoda kontroli pochodzenia na podstawie grup krwi u bydła została wprowadzona w latach 60. ubiegłego stulecia. Od 1969 roku Instytut Zootechniki został zobowiązany do organizowania i prowadzenia Krajowego Systemu Kontroli Pochodzenia Zwierząt Gospodarskich. Podstawą prowadzenia kontroli rodowodów w oparciu o oznaczenia antygenów krwi jest posiadanie i ciągle odtwarzanie identyczne-

go zestawu reagentów testowych, zgodnych z normami międzynarodowymi. Dział Immunologii i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB jest obecnie jedynym ośrodkiem w kraju uzyskującym surowice identyfikujące poszczególne antygeny krwinkowe bydła i dysponuje 96 reagentami odpowiadającymi międzynarodowym standardom.

Obecnie na świecie stosuje się dwie metody kontroli pochodzenia bydła: w oparciu o polimorfizm grup krwi oraz sekwencji mikrosatelitarnych DNA (Mancini i in., 1989; Materiały Międzynarodowego Testu Porównawczego, 1997/98, 1999/2000; Radko i in., 2002; Rehout i in., 2006; Rychlik i Duniec, 2004). Badania Holma i Bendixena (1996) wykazały, że prawdopodobieństwo prawidłowego wykluczenia ojcostwa za pomocą testu molekularnego (multiplex PCR – 6 sekwencji mikrosatelitarnych jednocześnie) wynosi 0,99, a za pomocą analizy 11 systemów grupowych krwi 0,98.

Również badania własne (Rychlik i in., 2005) przeprowadzone na bydło pc wykazały dużą przydatność zarówno grup krwi, jak i poli-

morficznych sekwencji mikrosatelitarnych DNA w kontroli rodowodów.

Produkcja i standaryzacja surowic testowych

Użycie grup krwi do kontroli pochodzenia wymaga posiadania odpowiedniego zestawu surowic testowych, gdyż prawdopodobieństwo wykluczenia niezgodnych osobników zależy w dużej mierze od ilości i jakości posiadanych reagentów testowych, pozwalających na identyfikację dziedzicznych antygenów erytrocytów.

Materiał doświadczalny do izoimmunizacji i absorpcji w celu uzyskania surowic odpornościowych stanowiły zwierzęta odpowiednio dobrane pod względem składu antygenowego czerwonych krwinek, pochodzące z obór Instytutu Zootechniki PIB. Do standaryzacji uzyskanych reagentów wykorzystane były krwinki przesyłane do Laboratorium z terenu całego kraju. Surowice odpornościowe uzyskiwano z krwi zwierząt biorców, poddanych wcześniej immunizacji krwinkami dawców. Dobór dawców i biorców następował w oparciu o skład antygenowy ich krwi (przykład).

Przykład: Immunizacja bydła

Dawca: krowa 342 Kłapa posiadająca antygeny krwinkowe						
A1HDB8	E'3G'P'2Q'G''1Q''	C2EW1X2L'X'C''2	F1	M2	N' S'	
Biorca: krowa 587 Maleńka posiadająca antygeny krwinkowe						
A1HDB8	B1I1O2A'1E'1P'2K'P'Q'Q''	C1ER1W1X2L'X'C''1	F1	L	M2	H' Z2 N' S'
Spodziewane przeciwciała:			G' G''1 G''2			
Otrzymane przeciwciała po wykonaniu odpowiednich absorpcji:			G'			

W trakcie immunizacji u biorców prowadzone były badania, określające ich odpowiedź immunologiczną na wprowadzone antygeny. Od biorców, w których surowicy pojawiły się pożądane przeciwciała o odpowiednim mianie, pobierana była krew, a uzyskana z niej surowica odpornościowa stanowiła substrat do produkcji reagentów testowych. Otrzymane surowice odpornościowe poddane zostały szczegółowej analizie w celu określenia typów powstałych przeciwciał i ustalenia optymalnych warunków absorpcji, których spełnienie pozwala uzyskać z danej surowicy odpornościowej specyficzne reagenty testowe.

Dla każdego reagentu drogą eksperymentów ustalono optymalne warunki absorpcji uwzględniające następujące parametry:

- stopień rozcieńczenia surowicy poliwalentnej przed absorpcjami,
- ustalenie, od których zwierząt należało użyć krew do absorpcji,
- stosunek objętościowy krwi absorbenta do surowicy absorbowanej,
- ilość powtórzeń absorpcji,
- czas trwania poszczególnych absorpcji.

Próbki każdego z uzyskanych reagentów poddawano absorpcji krwią co najmniej dziesięć-

ciu zwierząt reagujących pozytywnie. Jest to tak zwany test na monowalentność. Zgodnie z przyjętym w badaniach grup krwi kryterium, za monowalentne uważa się takie reagenty, w których po absorpcji krwinkami pozytywnie reagujących zwierząt nie pozostają żadne antyerythrocytarne przeciwciała. Surowice testowe z opracowanymi szczegółowo warunkami absorpcji przekazywane były zespołowi pracowników zakładu, którzy przygotowywali zestawy reagentów testowych dla potrzeb laboratoriów wykonujących kontrolę wiarygodności rodowodów u bydła w Polsce i służyły do określania składu antygenowego krwi badanych zwierząt.

Przeprowadzone immunizacje i reimmunizacje krów pozwoliły uzyskać surowice izoodpornościowe, które stanowiły bazę do otrzymywania reagentów testowych. Liczba przeprowadzonych immunizacji i reimmunizacji, wykonanych analiz serologicznych, prowadzących do ustalenia procedur otrzymywania poszczególnych reagentów, była zależna od zapotrzebowania na reagenty do prowadzenia w kraju badań kontroli pochodzenia bydła. Prowadzona była także systematyczna standaryzacja uzyski-

wanych reagentów testowych w organizowanych przez ISAG Międzynarodowych Testach Porównawczych (tab. 1). Wyniki międzynarodowych testów porównawczych wykazały, że Laboratorium Działu Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB posiada najszerzy zestaw reagentów testowych spośród laboratoriów biorących udział w teście, a ich wysoką specyficzną potwierdziły wyniki kilku ostatnich testów porównawczych organizowanych przez ISAG.

W ostatnim piętnastoleciu kontrola rodowodów bydła była prowadzona przy użyciu identycznego zestawu 60 reagentów testowych (tab. 2). Opracowywano również procedury dla ponad 30 reagentów do zestawu poszerzonego, który służył do badań specjalnych. Rozszerzonym zestawem reagentów testowano krwinki przesyłane do Laboratorium Działu Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ PIB w celu określenia składu antygenowego krwi u buhajów, w badaniach nad dziedziczeniem nowo poznanych antygenów krwinkowych, jak również przy wykonywaniu różnego typu ekspertyz wymagających badań poszerzonych.

Tabela 1. Wykaz międzynarodowych testów porównawczych bydłych reagentów testowych zorganizowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG)
Table 1. List of international comparison tests of bovine reagents organized by the International Society for Animal Genetics (ISAG)

Test Międzynarodowy <i>International Test</i>	Liczba uczestniczących laboratoriów <i>No. of laboratories involved</i>	Liczba porównywanych reagentów standardowych <i>No. of standard reagents compared</i>	Liczba reagentów poddanych standaryzacji z Laboratorium IZ PIB <i>No. of standardized reagents from NRIAP Laboratory</i>
1993/1994	37	104	86
1995/1996	32	101	86
1997/1998	30	101	87
1999/2000	30	102	92
2003/2004	18	101	92

Potwierdzanie pochodzenia

Oznaczanie grup krwi u bydła przeprowadza się w teście hemolitycznym przy użyciu surowic testowych wykrywających antygeny

erythrocytarne. W wyniku testu hemolitycznego określa się skład antygenowy krwi badanych osobników, który jest podstawą do analizy dziedziczenia grup krwi.

Tabela 2. Bydłęce reagenty testowe otrzymywane w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB

Table 2. Bovine reagents obtained at the Department of Animal Immuno- and Cytogenetics of the National Research Institute of Animal Production

Układy grupowe <i>Group systems</i>	Reagenty zestawu podstawowego <i>Basic set of reagents</i>	Dodatkowe reagenty zestawu poszerzonego <i>Extended set of reagents</i>
A	A1, A2, H, Z'	D, PLB-4, PLB-8
B	B2, G1, G2, I1, I2, K, O1, O2, O3, O4, P2, Q2, T1, Y2, A'2, B', D'1, E'1, E'2, G', I'1, J'1, K', O'2, P', Q', Y', G''1, G''2,	B1, G3, O5, P1, T2, Y 1, A'X, A'1, A'3, D'2, E'3, I'2, J'2, A''2, B'', D'', J'', O'', Q''
C	C1, C2, E, R1, R2, W2, X1, X2, C', L', C''2	PLB-9, W1, XO, X', C''1,
F	F1, V2,	F2, V1, F/F
J		J
L	L	
M	M	
S	S, U1, U2, H', U'1, U'2, H'', U''	
Z	Z1	Z2
N'		N'
R'	R', S'	
T'	T'	

Do przeprowadzenia analizy dziedziczenia grup krwi, potrzebnej do potwierdzenia pochodzenia, niezbędna jest znajomość praw dziedziczenia grup krwi i zależności pomiędzy antygenami krwinkowymi.

Na podstawie dziedziczenia cech antygenowych, przekazywanych przez rodziców na potomstwo, ustalono trzy prawa dziedziczenia grup krwi:

I prawo. Nie może być potomkiem danej pary rodziców osobnik, który posiada cechę antygenową nie stwierdzoną przynajmniej u jednego z dwu domniemych rodziców.

II prawo. Osobnik – homozygota w odniesieniu do dwóch allelicznych cech, np. F/F, nie może być potomkiem osobnika homozygoty pod względem cechy przeciwstawnej, np. V/V.

III prawo. Każdy osobnik musi posiadać po jednym z dwóch alleli od ojca i matki w każdym układzie grupowym.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki badań kontroli rodowodów bydła w latach 1994–2008. Od 2006 roku ze względu na dużą skuteczność wykrywania niewłaściwych rodziców (99,999%) za pomocą wysokopolimorficznych markerów mikrosatelitarnych DNA (Radko, 2008), obok grup krwi rozpoczęto również wykorzystywanie tych markerów w kontroli rodowodów bydła w Polsce. Analizując wyniki rodowodów z ostatnich 15 lat należy pozytywnie ocenić fakt, że ogólna liczba bydła hodowlanego o niezgodnych rodowodach uległa zmniejszeniu, a średni procent niezgodności w ciągu ostatnich trzech pięcioletek obniżył się z 12,8 (lata 1994–1998) do 8,1 (lata 2006–2008).

Systematycznie prowadzona kontrola pochodzenia bydła umożliwia wykrycie niezgodności w rodowodach u tego gatunku zwierząt. Wyniki kontroli, przekazywane corocznie do wiadomości Krajowego Centrum Hodowli Zwierząt w Warszawie, Polskiej Federacji Ho-

dowców Bydła Mlecznego i Producentów Mleka w Warszawie oraz zainteresowanych hodowców pozwalają na podejmowanie decyzji zmierzających do porządkowania dokumentacji zootechnicznej i korygowania błędnych rodowodów.

Tabela 3. Liczba wykonanych ekspertyz i testów genetycznych u bydła oraz średni procent zwierząt nie pochodzących po podanych w rodowodach rodzicach
 Table 3. Number of genetic analyses and tests of cattle and mean number of animals with incorrect pedigrees

Rok Year	Liczba wykonanych ekspertyz No. of tests performed	Ilość wykluczeń No. of incorrect pedigrees	Procent wyłączeń Percentage of incorrect pedigrees	Liczba wykonanych testów genetycznych dla buhajów zakupywanych do SHiUZ No. of genetic tests of bulls purchased by AI Stations
1994	9732	1168	12,0	381
1995	12587	1888	15,0	376
1996	13201	1848	14,0	269
1997	15875	1921	12,1	424
1998	12371	1385	11,2	263
Razem – Total 1994–998	63766	8210	12,8	1713
1999	11154	1048	9,4	379
2000	12319	1121	9,1	150
2001	9594	1017	10,6	331
2002	7503	750	10,0	281
2003	10198	928	9,1	221
Razem – Total 1999–2003	50768	4864	11,7	1362
2004	10427	1090	10,4	167
2005	10727	1085	10,1	213
2006	14022 a	963	6,5	359
2007	15321 b	1139	7,4	364*
2008	11622 c	767	6,6	214**
Razem – Total 2005–2008	62119	5044	8,1	1317

a - W tym 163 ekspertyzy na podstawie badań DNA – including 163 tests based on DNA.

b - W tym 1527 ekspertyz na podstawie badań DNA – including 1527 tests based on DNA.

c - W tym 3080 ekspertyz na podstawie badań DNA – including 3080 tests based on DNA.

* W tym dla 166 buhajów ustalono profil sekwencji mikrosatelitarnych DNA – including microsatellite DNA sequence profile determined for 166 bulls.

** W tym dla 155 buhajów ustalono profil sekwencji mikrosatelitarnych DNA – including microsatellite DNA sequence profile determined for 155 bulls.

Doboru zwierząt na rodziców następnych pokoleń dokonuje się na podstawie dokumentacji zootechnicznej, dlatego musi być ona zgodna ze stanem faktycznym. Kontrola wiary-

godności pochodzenia stanowi zatem jedną z podstaw wszelkich poczynań hodowlanych, pozwala bowiem usunąć z hodowli osobniki nie pochodzące po wartościowych, podanych

w rodowodach przodkach. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń markerów genetycznych krwi uzyskiwane w trakcie rutynowej kontroli pochodzenia są również wykorzystywane w pracach

z dziedziny genetyki populacji do badań struktury genetycznej różnych ras oraz zmienności genetycznej wewnątrz i między różnymi populacjami bydła.

Literatura

Ferguson L.C. (1941). Heritable antigens in the erythrocytes of cattle. *J. Immun.*, 40: 213–242.

Ferguson L.C., Stormont C., Irwin M.R. (1942). On additional antigens in the erythrocytes of cattle. *J. Immun.*, 44: 147–164.

Holm L.E., Bendixen C. (1996). Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Anim. Genet.*, 2 (Suppl. 2): 17–42.

Mancini M.G., Zanotti Casati M. (1989). Parentage control during the last 20 years of the most important Italian cattle breeds. *Anim. Genet.*, 20, Suppl. 1.

Materiały ISAG Comparison Test Cattle (1999/2000). Institut für Tierzucht und Genetik Veterinärmedizinische Universität Wien.

Materiały Międzynarodowego Testu Porównawczego (1997/1998). ISAG Cattle Comparison Test, Institut für Tierzucht und Genetik Veterinärmedizinische Universität Wien.

Radko A., Duniec M., Ząbek T., Janik A., Natonek

M. (2002). Polimorfizm 11 sekwencji mikrosatelitarnych DNA i ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia bydła. *Med. Wet.*, 58, 9: 708–710.

Radko A. (2008). Ocena polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych DNA wykorzystawanych w kontroli rodowodów bydła w Polsce. *Wiad. Zoot.*, 46, 4: 3–8.

Rehout V., Hradecka E., Citek J. (2006). Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech. J. Anim. Sci.*, 51, 12: 503–509.

Rychlik T., Duniec M. (2004). Produkcja i standaryzacja reagentów testowych niezbędnych w kontroli pochodzenia bydła. *Zesz. Nauk. PTZ, Prz. Hod.*, 72, 1: 315–322.

Rychlik T., Radko A., Słota E. (2005). Analiza porównawcza polimorfizmu grup krwi i sekwencji mikrosatelitarnych DNA u bydła polskiego czerwonego. *Mat. LXX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego we Wrocławiu. Komunikaty Naukowe*, s. 50.

Stormont C., Irwin M.R., Owen R.D. (1945). A probable allelic series of genes affecting cellular antigens in cattle. *Genetics*, 30: 25–26.

USE OF BLOOD GROUP TESTS FOR CATTLE PEDIGREE VERIFICATION

Summary

Animal breeding records, which are a basis for selection of animals to be parents of the next generation, must reflect the actual situation to guarantee breeding progress. Breeding records are verified through parentage testing and identification of animals based on selected blood genetic markers of offspring and their parents. In Poland, cattle pedigrees are verified based on blood group tests and microsatellite DNA polymorphism. Blood groups are determined using the laboratory's own test sera, standardized in international comparison tests. Tests on the polymorphism of erythrocyte antigens in 11 blood group systems of Polish Red cattle showed that the probability of incorrect parentage assignment is 99.98%. The use of highly polymorphic microsatellite DNA sequences makes it possible to increase the probability of incorrect parentage assignment up to 99.999%.

Analysis of the pedigree data verified over the last 15 years showed that the number of cattle with incorrect pedigrees is steadily decreasing and the mean percentage of incorrect parentage assignment decreased during the last three 5-year periods from 12.8% (1994–1998) to 8.1% (2004–2008).