

Proyecto INNOVACIÓN EN EL PROCESO DE ERRADICACIÓN Y DE CALIFICACIÓN SANITARIA DEL IBR, EN LAS EXPLOTACIONES DE VACUNO DE ARAGÓN – “IBovinR Aragón” presentado a la Convocatoria de subvenciones de apoyo a Acciones de Cooperación de Agentes del Sector Agrario, en el marco del Programa de Desarrollo Rural para Aragón 2014-2020, para 2021 (ORDEN AGM/44/2021, de 26 de enero, BOA núm.32 de 15 de febrero de 2021)

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Entidades beneficiarias:

SAT Nº: 188 R.L. Ganadera Parda de Montaña

MIRIAM FERRES DECLAER

LORENA PARDO COBOS

ERNESTO MARIN COARASA

ALEJANDRO ARNAL PLANA

Miembros no beneficiarios:

CENTRO DE INVESTIGACION Y TRANSFERENCIA AGROALIMENTARIA DE ARAGON – CITA.
(Socio y Centro Tecnológico, No Beneficiario)

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. Departamento de ANATOMÍA, EMBRIOLOGIA Y GENÉTICA -
IA2. (Socio y Centro Tecnológico, No Beneficiario)

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Este es un proyecto de Innovación en el proceso de erradicación y de la calificación sanitaria del IBR, en las explotaciones ganaderas de bovino de Aragón, cuyo Acrónimo es IBovinR Aragón.

Es un proyecto que se ha desarrollado totalmente en Aragón, fundamentalmente en comarcas de alta montaña y zonas desfavorecidas, también en los centros tecnológicos y en el Laboratorio Agroambiental de Aragón, abarcando la totalidad de las zonas red Natura 2000 de la CC.AA. de Aragón.

La aplicación de los resultados del proyecto será extrapolable al resto de las explotaciones ganaderas de vacuno.

La estructura del grupo de cooperación ha integrado en su trabajo a todos los actores necesarios en la cadena de valor, estableciendo líneas de trabajo cuyo objetivo es mejorar la rentabilidad de las explotaciones agrarias, diversificar los riesgos de las mismas, trabajar en el ámbito de la sanidad animal, y promover el valor añadido de los productos agroalimentarios y de cercanía.



Unión Europea

Fondo Europeo Agrícola
de Desarrollo Rural

Europa invierte en las zonas rurales

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Los objetivos principales que se marcaron fueron:

- Impulsar acciones comunes, de carácter innovador, que contribuyan a la erradicación del IBR en las explotaciones extensivas de vacuno de Aragón.
- Impulsar acciones comunes, de carácter innovador, que contribuyan a la erradicación del IBR en las explotaciones de vacuno de cebo de Aragón.

Impulsar y lograr la máxima calificación sanitaria de IBR, en las explotaciones ganaderas de vacuno de Aragón, aplicando lo dispuesto en el RD 554/2019, de 27 de septiembre, por el que se establecen las bases de las actuaciones de prevención, control y erradicación de la rinotraqueítis infecciosa bovina y se establece un programa nacional voluntario de lucha contra dicha enfermedad

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Para conseguir estos objetivos se ha realizado:

- Análisis de sangre de animales entre 9 y 36 meses, de las explotaciones de socios beneficiarios y no beneficiarios, en el Laboratorio Agroambiental de Aragón mediante técnicas ELISA para detectar anticuerpos gE frente al virus de la rinotraqueítis bovina (BHV-1), según kit de Ingenasa y para las muestras que han arrojado un resultado positivo o dudoso con dicho kit, se realizó una segunda analítica de anticuerpos gE frente al virus de la rinotraqueítis bovina (BHV-1), según kit de IDEXX, con el fin de detectar los animales que han estado en contacto con el virus.
- Compra de vacunas de IBR de manera conjunta para las explotaciones de los socios beneficiarios, y así conseguir un precio más asequible que si se realizase la compra por separado.
- Para seguir con las vacunaciones en explotaciones donde ya se hacía vacunación frente a IBR o empezar a vacunar en otras donde no se había vacunado nunca.
- Se formalizó un contrato de investigación para regular la colaboración entre la empresa y la UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA para el desarrollo de las actividades del estudio genético de la enfermedad Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) dentro del proyecto.
- Como objetivo general de este estudio genético: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE MUESTRAS DE SANGRE DE GANADO VACUNO VACUNADO FRENTE A LA RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

DESARROLLO DEL PROYECTO

Los animales diana comprendían edades entre los 9 y 36 meses, pertenecientes a los 27 miembros beneficiarios y no beneficiarios que participaron en el proyecto. También se aprovechó actuaciones sobre animales de otras ganaderías para tener un mayor número de datos.

Al estar la mayor parte de los animales vacunados y no contar con animales enfermos (analizamos sangre de dos animales sospechosos pero dieron negativo), nos planteamos analizar si existían respuestas distintas a la vacunación con una base genética, así el planteamiento inicial consistía en una primera visita a la explotación para la extracción de sangre con destino al Laboratorio de Genética de la Universidad de Zaragoza y para el Laboratorio Agroambiental además se inoculó la vacuna a cada animal. Al paso de un mes se volvería a sangrar a los animales para analizar la seroconversión de estos una vez vacunados. Para determinar esa posible base genética de “Buena respuesta a la vacuna” era necesario contar con animales vacunados con distintos títulos de Anticuerpos.

Tras encontrarnos con graves problemas para identificar animales con alta, media y baja carga de anticuerpos, pues los test de ELISA disponibles nos aportan información cualitativa (respuesta positiva o negativa) pero no cuantitativa respecto a la respuesta inmune de los animales, por tanto, se decidió realizar estudios genéticos sobre el IBR, con la premisa de intentar conocer la respuesta inmune y los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta a la vacunación y establecer si había diferencias entre individuos. Para ello analizamos el perfil de expresión génica de las células sanguíneas de animales antes de la vacunación y mes y medio después de la misma, procurando analizar animales con características homogéneas (misma edad, misma explotación, etc).

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

4.1 Metodología

Se realizaron los pasos siguientes:

- [Extracción de RNA de las muestras de sangre](#)
- [Secuenciación mediante RNA-seq](#)
- [Análisis bioinformático](#)

Extracción de RNA de las muestras de sangre

La extracción de RNA de las 24 muestras de sangre, 12 previas a la vacunación y 12 tras la vacunación, se realizó mediante el uso del kit TempusTM Spin RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras de RNA tuvieron una concentración adecuada para su posterior secuenciación mediante la tecnología RNA-seq (Tabla 1).

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Animal	Muestra	[Qubit]ng/μl	
5936	1	66,2	ANTESEVACUNAR
5951	2	127	
5949	3	63	
6801	4	181	
5943	5	154	
0194	6	120	
5939	7	244	
1288	8	220	
5947	9	151	
5946	10	180	
6806	11	284	
6795	12	166	
5936	1V	123	TRAS VACUNAR
5951	2V	134	
5949	3V	250	
6801	4V	175	
5943	5V	101	
0194	6V	104	
5939	7V	178	
1288	8V	212	
5947	9V	130	
5946	10V	87,6	
6806	11V	224	
6795	12V	142	

Tabla 1. Concentración deRNA de cada una de las muestras (ng/μl) medida con el fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Para incrementar el Intercambio de conocimientos con los ganaderos, tanto participantes como no del proyecto se ha aprovechado las visitas que se hacían a los mismos para irles informando tanto de los resultados que se iban obteniendo durante la evolución del proyecto, como de las características de la enfermedad y sus consecuencias.

Se hicieron pruebas analíticas a dos animales con síntomas compatibles con la enfermedad de IBR, pero dieron negativo a la misma.

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Análisis funcional

Se buscó información sobre las funciones de los 30 genes con expresión génica diferencial tras la vacunación. Algunos de estos genes parecen estar involucrados en la respuesta inmune y en el metabolismo de los ácidos grasos, los cuales también parecen ser capaces de modular la respuesta inmunitaria (información detallada en tabla Excel suplementaria: Anexo 1).

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Anexo 1. Tabla informativa de las posibles funciones de los 30 genes diferencialmente expresados tras la vacunación. Están marcados en rosa los genes con expresión disminuida y en azul los genes con expresión aumentada. Se han señalado en amarillo los genes que podrían ser de mayor interés.

Gene ID	Nombre del gen	log2FoldChange	padj	Función
ENSBTAG00000012192	APOI4	-1.840803047	0.035432141	Novel gene. Ortólogo de humano: gen APOI4. Apolipoprotein I4.
ENSBTAG00000006354	HP	0.590770277	3.1792E-06	haemoglobin. The protein encoded exhibits antimicrobial activity against bacteria. Related to Innate Immune System.
ENSBTAG000000031950	RAB3IP	-0.670535413	0.005222246	-
ENSBTAG00000015032	CD14	-0.605404974	0.024913788	The protein encoded by this gene is a surface antigen that is preferentially expressed on monocytes/macrophages. It cooperates with other proteins to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide, and to viruses.
ENSBTAG000000021999	CPT1A	-0.58835397	0.027382894	Associated with the mitochondrial oxidation of long-chain fatty acids. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38043447/ (en este artículo asocian la infección de herpesvirus tipo 1, que es el que causa el IBR, con una disminución de la expresión de este gen).
ENSBTAG000000004150	NRG1	-0.537927412	0.010967714	The protein encoded by this gene is a membrane glycoprotein that mediates cell-cell signaling and plays a critical role in the growth and development of multiple organ systems.
ENSBTAG000000052155	TMSB15A	0.710813766	0.005222246	Novel gene. Ortólogo de humano: gen TMSB15A.
ENSBTAG000000046547	CIDEA	1.560581253	0.024913788	Protein Cidea that has been shown to activate apoptosis.
ENSBTAG00000007798	DGAT2L6	1.590430371	0.03370861	-
ENSBTAG000000038325	CE54A	2.381308403	0.027382894	This gene may play a role in the detoxification of drugs and xenobiotics in neural and other tissues of the body and in the cerebrospinal fluid.
ENSBTAG000000012222	FA2H	2.418891109	0.002782785	This gene encodes a protein that catalyzes the synthesis of 2-hydroxysphingolipids, a subset of sphingolipids that contain 2-hydroxy fatty acids.
ENSBTAG000000011752	SYNM	2.495485448	0.012418864	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38056979/ (gen asociado con el carácter de conformación corporal en vacas).
ENSBTAG000000070082	-	2.655556788	0.027382894	Novel gene.
ENSBTAG000000059651	-	3.357142158	0.022602776	Novel gene.
ENSBTAG000000010123	APOE	3.418549697	0.045583214	Expresión elevada de este gen se asocia con infiltrados inmunitarios y una mejor respuesta inmune en pacientes con cáncer (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35371313/).
ENSBTAG000000067148	CYP17A1	3.610965895	0.022602776	-
ENSBTAG000000015700	ELCVL3	3.821248541	0.002782785	Members of this family play a role in elongation of long chain fatty acids to provide precursors for synthesis of sphingolipids and ceramides.
ENSBTAG000000015091	MOGAT2	3.823221996	0.027544064	Novel gene. Ortólogo de humano: gen MOGAT2. The encoded protein is important in the uptake of dietary fat by the small intestine.
ENSBTAG000000006231	ACSRG1	4.037586165	0.035432141	It is thought to play a central role in brain very long-chain fatty acids metabolism and myelinogenesis.
ENSBTAG000000012456	PSAPL1	4.146943841	0.017705039	May play a role in the lysosomal degradation of sphingolipids.
ENSBTAG000000018570	SDR16C5	4.186406521	0.027382894	-
ENSBTAG000000012275	ENDOU	4.316027447	0.003863703	This gene promotes tolerance to self-antigens by regulating B cell activation-induced cell death.
ENSBTAG000000015690	PUM1	4.443216899	0.024913788	May function as a coat protein involved in the biogenesis of lipid droplets.
ENSBTAG000000007583	KRT14	4.647012061	0.042442671	Member of the keratin family.
ENSBTAG000000037483	MOGAT2	5.390130252	0.010143898	Novel gene. Ortólogo de humano: gen MOGAT2. The encoded protein is important in the uptake of dietary fat by the small intestine.
ENSBTAG000000040321	SDR16C6	5.867224339	0.000380072	Pseudogene.
ENSBTAG000000009707	MVLI	11.61012778	0.049682417	This gene encodes a myosin alkali light chain expressed in fast skeletal muscle.
ENSBTAG000000046332	ACTA1	11.72778019	0.045120018	This actin is an alpha actin that is found in skeletal muscle.
ENSBTAG000000013921	CKM	12.75973146	0.022602776	The protein encoded by this gene is a cytoplasmic enzyme involved in energy homeostasis and is an important serum marker for myocardial infarction.
ENSBTAG000000017743	XIRP2	13.10084091	0.016302052	Involved in actin cytoskeleton organization and heart development.

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

Análisis de enriquecimiento

Por último, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento mediante el programa ShinyGO versión 0.80 apoyado por la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). El análisis de enriquecimiento permite la identificación de vías metabólicas o vías de transducción de señales significativamente enriquecidas ($FDR < 0,05$) asociadas con genes expresados diferencialmente. En este caso, se identificaron cuatro rutas diferentes que cambiaron más de lo esperado y que están relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos, que se muestran en la siguiente Figura (Figura 5

Proyecto IBovinR Aragón GCP20211001100

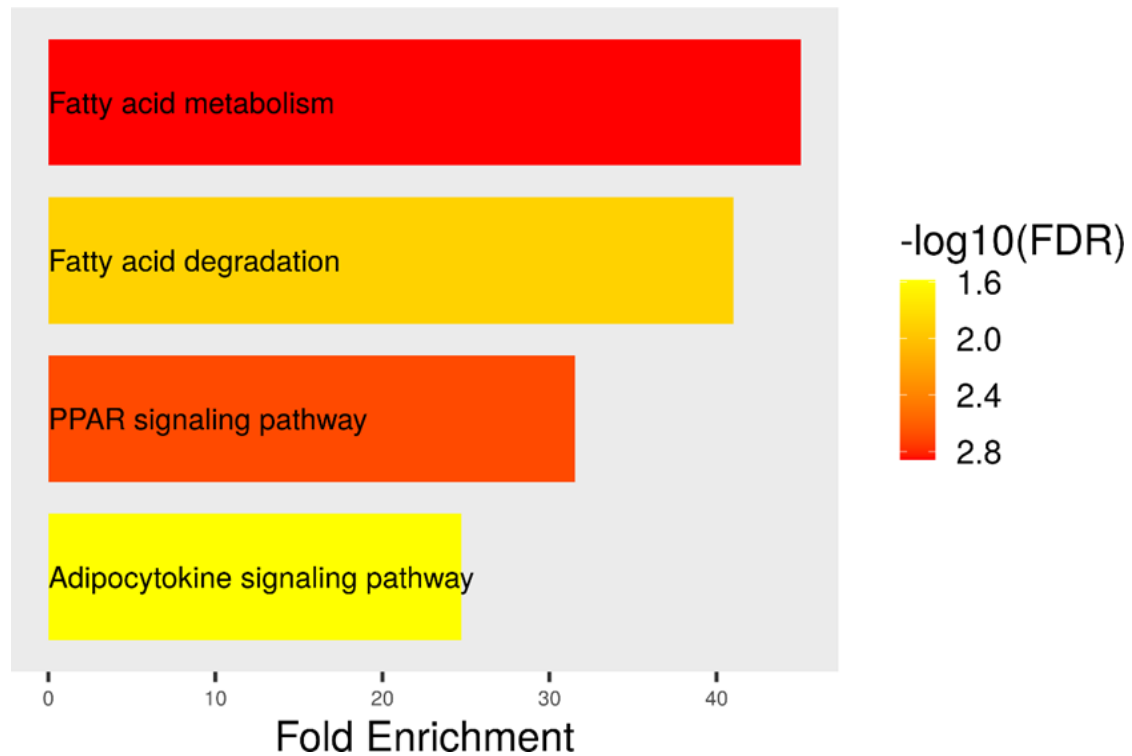


Figura 5. Análisis de enriquecimiento KEGG de los genes diferencialmente expresados tras la vacunación

Proyecto IBovinR Aragón

GCP20211001100

CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se ha realizado el estudio y con las muestras recogidas, podemos concluir:

- La concentración de RNA de todas las muestras fue adecuada para la secuenciación.
- La secuenciación mediante la tecnología RNA-seq obtuvo secuencias de alta calidad que se usaron para el posterior análisis bioinformático.
- El nivel de expresión génica fue similar en todas las muestras sin una clara agrupación de los dos grupos muestrales.
- Se identificaron 30 genes con expresión diferencial tras la vacunación: 6 genes con expresión disminuida y 24 genes con expresión aumentada.
- Algunos de los genes diferencialmente expresados parecen estar asociados con la respuesta inmune y el metabolismo de los ácidos grasos.
- Sería necesario profundizar en nuevos estudios, para conocer que genotipo de estos genes candidatos podría favorecer una fuerte respuesta inmune frente a la enfermedad.
- Aunque sólo el 10.71% de los animales son seropositivos están ampliamente repartidos en el territorio ya que la mitad de las explotaciones analizadas tienen algún positivo. Esto enfatiza el interés de los ganaderos en erradicar la enfermedad.