

CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE BOLA-DRB3 CON EL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS, EN LA RAZA HOLSTEIN EN ANTIOQUIA, COLOMBIA

CARATERIZATION AND ANALYSIS OF ASOCIATION OF BOLA-DRB3 WITH THE SOMATIC COUNT CELL, IN HOLSTEIN CATTLE IN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Esperanza Trujillo-Bravo¹, Paola A. Rodríguez-Y.¹, Mario Ceron-Muñoz²

Resumen

En el presente estudio se investigó la asociación entre BoLA-DRB3, resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas como mastitis en bovinos y alto conteo de células somáticas (SCS), en una población de la raza Holstein en Antioquia (Colombia). Se encontró un promedio de SCS de 3,14 y los resultados permitieron establecer que el alelo BoLA-DRB3-185 presentó una asociación significativa ($p < 0,05$) con alto SCS. No se detectó asociación de ninguno de los alelos DRB3 encontrados con presencia o ausencia de mastitis. Además, BoLA-DRB3 en ésta población es altamente polimórfico y los alelos 183, 185 y 193, fueron detectados con la mayor frecuencia en la población Holstein colombiana analizada. La población se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Palabras clave: BoLA, células somáticas, DRB3, Holstein, mastitis, Colombia.

Abstract

The association of BoLA-DRB3 with resistance and susceptibility to infectious diseases and somatic count cell (SCS) were investigated in the breed Holstein of Antioquia (Colombia). It was found in the population one middle of SCS of 3.14 and the results of this study demonstrated that the BoLA-DRB3-185 allele, is associated with high SCS. It was not found association of alleles DRB3 with mastitis. BoLA-DRB3 is highly polymorphic, and alleles 183, 185, and 193 were detected with high frequency in Colombian Holstein. This population showed Hardy-Weinberg equilibrium.

Key words: BoLA, DRB3, Holstein, mastitis, somatic cell, Colombia.

INTRODUCCIÓN

Los alelos de varios *loci* en la región BoLA o Complejo mayor de Histocompatibilidad bovino (*Bovine Leucocyte Antigen*), pueden tener una utilidad funcional como marcadores genéticos de alto y bajo riesgo de ocurrencia de enfermedades en bovinos (Aarestrup et al., Klein, 1983; 1995; Lunden et al., 1990; Sharif et al., 1998, 2000). Han sido mapeados en el brazo corto del cromosoma 23

bovino y conforman 3 clases: I, II y III (Andersson y Davies, 1994).

Los productos de las clases I y II, son proteínas de membrana involucradas en la inducción y regulación de la respuesta inmune y normalmente son expresados por células del sistema inmune tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B. Los productos de la clase III tienen un amplio rango de actividades, incluyendo efectos citotóxicos

¹ Grupo de Investigación en Genética y Mejoramiento Animal. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <etbravo@epm.net.co>.

² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <mceronm@agronica.udea.edu.co>.

(factores de necrosis tumoral) y actividades enzimáticas del tipo 21 α -hidroxilasa (Andersson y Davies, 1994). Los genes BoLA clase II están distribuidos en dos regiones diferentes, IIa y IIb. La región IIa involucra los genes DRA, DRB, DQA, DQB y la región IIb a DOB, DYA, DYB, DIB (Davies et al., 1994).

El gen DRB de la región IIa presenta 3 *loci*: DRBP1, DRB2 y DRB3 (Andersson et al., 1986), de los cuales solamente DRB3 se expresa y es altamente polimórfico (Andersson y Davies, 1994; Gilliespie et al., 1999; Takeshima et al., 2002; Udina et al., 1998). De este *locus* se han detectado más de 66 alelos diferentes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Gilliespie et al., 1999; Van Eijk et al., 1992), y se ha determinado su asociación con mastitis clínica (Sharif et al., 1998), cetosis, retención de placenta, resistencia a *Staphylococcus aureus* (Berryere et al., 1994), y además, variaciones en el recuento de células somáticas (Dietz et al., 1997b; Oddgeirsson et al., 1988).

El propósito de este trabajo fue contribuir a la caracterización de los diferentes polimorfismos del microsatélite BoLA-DRB3 intrón 2, en la raza Holstein de la región del departamento de Antioquia, Colombia y determinar la asociación de cada uno de los alelos con los valores de conteo de células somáticas y con la presencia o ausencia de mastitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población del estudio. Se analizó una población de 131 hembras Holstein en producción, que fueron muestreadas en 5 localidades del departamento de Antioquia (Colombia), correspondientes a San Pedro de los Milagros, Belmira, Urrao, Santa Rosa de Osos y Entreríos. Estas 5 localidades fueron escogidas bajo parámetros de similares condiciones de alimentación (concentrado, pasto estrella) y ordeño mecánico. Las hembras fueron selecciona-

das en cada zona de muestreo, teniendo en cuenta paridad en el número de partos (mínimo 3) y recurrencia en el diagnóstico de mastitis clínica.

Las muestras se agruparon en dos subpoblaciones así: 83 animales con diagnóstico previo recurrente de mastitis clínica (**A** = afectado) y 48 con diagnóstico negativo de mastitis clínica (**No A** = no afectado). Para ésta clasificación se consideraron los registros históricos de casos de mastitis clínica en cada uno de los hatos, en los cuales los animales que habían presentado cuadros de leche anormal, fiebre y anorexia fueron clasificados como afectados.

Conteo de células somáticas. Se tomaron 15 ml de leche del ordeño total de cada individuo, se fijaron con dicromato de potasio (K_2CrO_4) y conservaron a 4 °C para posteriores análisis. El conteo de células somáticas (CCS) se hizo electrónicamente y el resultado fue analizado como variable fenotípica de referencia para ser comparado estadísticamente con la variable genética. Los valores de CCS fueron transformados a SCS (*Somatic cell score*) = $\text{Log}_2(\text{CCS}/100000) + 3$, debido a la variación que presentan (Ali y Shook, 1980).

Genotipificación. Se extrajeron 7 ml de sangre de cada animal en tubos vacutainer con EDTA, para aislar el DNA por el método de *Salting-out* y posterior precipitación con isopropanol (Miller et al., 1988).

Todos los individuos fueron genotipificados para BoLA-DRB3 intrón 2, utilizando los primers específicos 5'-CGCGAATCCCGAGTGAGTGAA-GTATCT-3 y 5-GAGAGTTTCTACTGTGCAG-3 (IDT, Coraville (Iowa), E. U. A), que amplifican una secuencia que varía entre 155pb y 215pb (Ellegren et al., 1993; Sigurdardottir et al., 1991).

Las condiciones de PCR fueron estandarizadas en un termociclador MJ Research (PTC 150), en 20 ml de reacción conteniendo: 0,7 mg de DNA, 1ml de buffer 10 x (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$ y 0,1% Tween 20), 1,25 mM de

MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerasa recombinante (*AMRESCO*), 2 mM de dNTPS y 0,25 pM de cada primer. Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 2%, corridos a 60 voltios durante 20 min. Posteriormente, fueron visualizados en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (acrilamida/bisacrilamida 19:1) al 6%, durante 90 min a 1,900 voltios. Finalmente, fueron teñidos con plata (protocolo de *PROMEGA Silver sequence DNA staining reagents*).

Métodos estadísticos. Para el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio Hardy-Weinberg, se utilizó el paquete estadístico *GENEPOP* Versión 3,3 (Raymond y Rousset, 1995). Para establecer la asociación entre los alelos detectados con el SCS y además el efecto de localidad sobre esta misma variable, los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1989), similar a estudios previos (Sharif et al., 1998), con el modelo: $Y_{ijk} = \mu + \text{hato}_i + \text{partos}_j + b_k \text{BoLA}_{ijk} + e_{ijkl}$. Donde Y_{ijk} es la variable dependiente SCS; μ es la media de la población; **hato_i** son los sitios del muestreo, $i = 1, 2, 3, 4$ y 5 ; **partos_j** es el número de partos en cada uno de los animales muestreados; $j = 1-4$; **b_k** = coeficiente de regresión; **BoLA_{ijk}** = efecto fijo del número de copias de los alelos BoLA_k presentes en los animales ($k = 1-10$, se utilizaron los alelos con mayor frecuencia); e_{ijkl} = error.

Para determinar la asociación de cada alelo con la presencia (**No A.**) o ausencia de mastitis (**A.**), se utilizó el procedimiento CATMOD (SAS Institute, 1989), con el modelo: $Y_{ijk} = \mu + \text{hato}_i + \text{partos}_j + b_l \text{BoLA}_{ijl} + e_{ijkl}$. Donde Y_{ijk} es la variable dependiente (mastitis clínica); μ es la media de la población; **hato_i** son los sitios del muestreo, $i = 1, 2, 3, 4$ y 5 ; **partos_j** es el número de partos en los animales muestreados, $j = 1-4$; **b_k** es el coeficiente de regresión para el número de alelos; **BoLA_{ijkl}** = efecto fijo del número de copias del los alelos BoLA_l presentes en los animales ($l = 1-10$, se utilizaron los alelos de mayor frecuencia); e_{ijkl} = error.

La relación de Odd de diferencia (**OR**) y su intervalo de confianza, fue calculado de acuerdo con Lemeshow y Hosmer (1984). Si el OR es mayor que 1, el factor es considerado como de alto riesgo según sea la variable analizada, presencia de la enfermedad o incremento en el recuento de células somáticas. Si OR es menor que 1, el factor puede interpretarse sin efecto sobre la enfermedad o sobre el recuento de células somáticas.

RESULTADOS

En la genotipificación de la muestra poblacional seleccionada, se detectaron 26 alelos para BoLA-DRB3. Los más frecuentes fueron 173, 181, 183, 185 y 193, que representan el 48,9% del total. El alelo de más alta frecuencia fue BoLA-DRB3-185 (tabla 1), corresponde a BoLA-DRB3.2*24 según la clasificación de Van Eijk et al. (1992) y a BoLA-DRB*0101 según Takeshima et al. (2002). La población se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg para este *locus*.

Tabla 1. Frecuencias de los diferentes alelos DRB3 en una población Holstein de Antioquia, Colombia (**n** = tamaño de la muestra alélica en la población Holstein; **Alelos** = todos los diferentes alelos encontrados en la población Holstein)

Alelos	n	Frecuencia	Alelos	n	Frecuencia
155	17	0,065	183	24	0,092
157	1	0,004	185	36	0,137
161	7	0,027	187	2	0,008
163	4	0,015	189	9	0,034
165	4	0,015	191	15	0,057
167	3	0,011	193	24	0,092
169	5	0,019	195	2	0,008
171	8	0,030	203	6	0,023
173	22	0,084	205	14	0,053
175	5	0,019	207	8	0,031
177	11	0,042	211	2	0,008
179	6	0,023	213	2	0,008
181	22	0,084	215	3	0,011

El conteo de células somáticas transformado SCS (Ali y Shook, 1980), presentó valores promedio en las subpoblaciones afectada y no afectada de 3,40 (1,34 DE) y 2,71 (0,95 DE), respectivamente. En la población total el SCS promedio fue de 3,14 (1,25 DE) (tabla 2), este valor es cercano a lo encontrado por Sharif et al. (1998) en Holstein canadiense, quienes encontraron promedios de SCS de 3,04.

Tabla 2. Registros históricos de mastitis clínica y promedio de SCS para afectadas (A.) y no afectadas (No A.) en Holstein de Antioquia, Colombia (n = número de animales; SCS = “Somatic cell score”, conteo de células somáticas transformado)

Holstein	n	Promedio SCS (desviación estándar)
A.	83	3,40 (1,34)
No A.	48	2,71 (0,91)
Total	131	3,14 (1,25)

El análisis con GLM de SAS (SAS Institute, 1989), mostró que el alelo 185 de DRB3 (DRB3.2-*24), tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$), sobre un alto SCS. El OR calculado para una copia del alelo 185 fue de 1,76 y de 2,05 para dos alelos (tabla 3). El análisis con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Institute, 1989), dio como resultado diferencias estadísticas significativas ($p = 0,05$) del efecto del alelo DRB3-185 sobre la presencia de mastitis clínica. Sin embargo, el OR encontrado para una copia del alelo fue de 0,75 y para dos copias fue de 0,39 (tabla 4). El efecto de localidad (zona de muestreo) sobre el SCS, fue altamente significativo en la población Holstein analizada ($p < 0,001$).

Tabla 3. Relación de diferencia (Odd Ratio = O. R.), e intervalo de confianza (I. C.) 95%, para el alelo DRB3-185 y su asociación con SCS (“Somatic cell score”, conteo de células somáticas transformado) (O. R. = mayor a 1, asociación del alelo 185 con incremento del SCS)

Alelo 185	O. R.	I. C. (95%)
0 y 1 copias	1,76	0,66-4,68
0 y 2 copias	2,05	0,38-1,08

Tabla 4. Relación de diferencia (Odd Ratio = O. R.), e intervalo de confianza (I. C.) 95%, para el alelo DRB3-185 y su asociación con presencia de mastitis (O. R. menor a 1 = no efecto del alelo 185 sobre presencia de mastitis)

Alelo 185	O. R.	I. C. (95%)
0 y 1 copias	0,75	0,29-1,94
0 y 2 copias	0,79	0,08-1,85

DISCUSIÓN

Las enfermedades que afectan la producción de leche en bovinos, especialmente involucran la salud de la ubre, entre ellas las de tipo infeccioso como mastitis. (Gill et al., 1990; Kaneene y Hurd, 1990). Estudios moleculares y epidemiológicos están dirigidos a investigar la asociación entre factores genéticos y la susceptibilidad del animal a enfermedades infecciosas (Acosta-Rodríguez et al., 2005; Lyons et al., 1991; Spooner et al., 1988). Tal es el caso de BoLA-DRB3, que ha sido extensamente evaluado en bovinos, principalmente en lo que se refiere al segundo exón y en relación con enfermedades infecciosas (Andersson y Davies, 1994; Klein, 1983).

En investigaciones previas el microsatélite del intrón 2 de DRB3, se ha encontrado estrechamente ligado a las secuencias del exón 2 del mismo locus, por lo cual existe una equivalencia entre los alelos del microsatélite y cada uno de los presentados por el exón 2 (Davies et al., 1994), permitiendo realizar análisis de DRB3 utilizando cualquiera de los dos grupos de alelos.

Este microsatélite, está compuesto de 10 dinucleótidos (TG)_n, una larga repetición de dinucleótidos (GA)_n interrumpidos y un corto número de tetranucleótidos (CAGA)_n. La evolución de este microsatélite involucra mutaciones de longitud en las repeticiones de dinucleótidos (Ellegren et al., 1993).

Este estudio demostró que el microsatélite del intrón 2 de BoLA-DRB3 es altamente polimórfico en la

población Holstein, región de Antioquia (Colombia) (tabla 1), comparado con resultados obtenidos en otras poblaciones de Jersey, Holstein europeo, criollo argentino y Saavedreno (Dietz et al., 1997a, b; Giovambattista et al., 1996; Guilliespie et al., 1999; Ripoli et al., 2004).

La mayor frecuencia encontrada para el alelo 185, difiere de otros resultados en ésta misma raza (Sharif et al., 1998), donde se encontró más frecuentemente el alelo BoLA-DRB3.2*8 (o 207, cuando se utiliza la técnica en geles de poliacrilamida). Este alelo 207 fue encontrado en la población Holstein de Antioquia con una frecuencia de 0,0305 (tabla 1). La diferencia en las frecuencias de los alelos encontrados en este estudio, con respecto a lo reportado en la literatura para esta misma raza, podría explicarse como el efecto de una constante selección artificial local, dirigida a los caracteres de producción. Sin embargo, esta es una variable que debe ser evaluada.

El promedio de SCS en animales con diagnóstico previo de mastitis (A.) comparado con los promedios en animales con diagnóstico negativo de mastitis clínica (No A.), mostró diferencias significativas ($p < 0,001$). Animales No A., mostraron en promedio valores bajos de SCS y animales A. presentaron valores mas altos (tabla 2). Investigaciones previas encontraron esta misma tendencia (Burvenich et al., 2002; Eberhart et al., 1982; Harmon, 1994), que permite además asumir que la mastitis clínica es un factor que afecta el conteo de células somáticas de acuerdo con resultados de Dietz et al. (1997a), donde consideran el SCS como una medida de la incidencia de mastitis.

La asociación con alto SCS encontrada con GLM de SAS (SAS Institute, 1989) para el alelo 185 (tabla 3), no ha sido determinada en estudios previos. En otras investigaciones, este alelo ha sido asociado con incrementos en problemas de salud de la ubre (Stankenburg et al., 1997), con susceptibilidad a infecciones intramamarias causadas por patógenos mayores (Dietz et al., 1997a) y con susceptibilidad a linfocitosis persistente causada por el

virus de leucemia bovina (Lewin, 1994). En reportes previos se han encontrado otros alelos de BoLA-DRB3 asociados con SCS. Dietz et al. (1997a) encontraron en Holstein asociación del alelo *16, con alto riesgo de incremento en SCS. Sin embargo Kelm et al. (1997), determinaron un efecto opuesto para este mismo alelo. El conflicto para este alelo fue explicado por Starkenburg et al. (1997), como el posible resultado de la presencia de varias clases de patógenos que determinan diferencias en la enfermedad, o a análisis realizados en poblaciones Holstein, que probablemente presenten diferencias en el ligamiento con otros *loci* BoLA.

El análisis de los promedios de SCS para cada uno de los alelos más frecuentes en la población Holstein evaluada y considerando el número de copias presentes de cada alelo, mostró que los alelos DRB3-155, 185 y 205 presentaron un incremento de SCS de acuerdo con el número de copias presentes, a mayor número de copias, mayor el valor de SCS. Los demás alelos no mostraron esta tendencia (tabla 5).

Tabla 5. Medias (+/- DE) de SCS, para cada uno de los alelos mas frecuentes en la población Holstein de Antioquia, Colombia (SCS = promedio de los valores de células somáticas transformados; d. e. = desviación estándar; Alelos = alelos mas frecuentes en la población muestreada; **0 copias** = ninguna copia del alelo DRB3; **1 copia** = una copia del alelo DRB3; **2 copias** = 2 copias del alelo DRB3; * = solo se encontró un animal)

Holstein Alelos	SCS (d. e.) 0 copias	SCS (d. e.) 1 copia	SCS (d. e.) 2 copias
155	3,07 (1,22)	3,51 (1,43)	5,22 *
173	3,14 (1,23)	3,11 (1,42)	3,77 *
177	3,10 (1,23)	3,67 (1,56)	2,49 *
183	3,16 (1,28)	3,03 (1,15)	3,22 *
185	3,05 (1,17)	3,29(1,38)	4,00 (1,74)
189	3,14 (1,26)	3,09 (1,36)	2,93 (0,65)
193	3,19 (1,29)	2,89 (1,04)	2,65 (0,87)
205	3,12 (1,22)	3,31 (1,64)	3,43 (1,04)

El efecto de la presencia o ausencia y del número de copias del alelo 185 sobre el promedio de SCS, en la población total y en cada una de las

subpoblaciones (A. y No A.), confirma que en la medida en que aumentó el número de copias del alelo 185, se incrementó el promedio de SCS, tan-

to en la población total como en A. y en No A. Este resultado podría explicarse como un efecto del número de copias de este alelo (tabla 6).

Tabla 6. Promedios de SCS para el alelo 185, en la población total y en las subpoblaciones afectada (A.) y no afectada (No A.) (SCS = promedio de conteo de células somáticas transformado; n = número de animales para cada grupo; d. e. = desviación estandar)

Alelo 185	Promedio SCS					
	n	Población total (d. e.)	n	A. (d. e.)	n	No A. (d. e.)
0 copias	102	3,05 (1,17)	67	3,25 (1,22)	35	2,66 (1,00)
1 copia	22	3,29 (1,38)	13	3,64 (1,58)	9	2,78 (0,88)
2 copias	7	4,00 (1,74)	3	5,47 (1,62)	4	2,91 (0,78)

En animales no afectados, se determinó un bajo promedio de SCS para cada uno de los grupos con cero, una y dos copias del alelo 185 (tabla 6), los valores de SCS entre estos tres grupos no mostraron diferencias significativas. Los promedios de SCS encontrados en la subpoblación No A., en relación con la presencia o ausencia del alelo 185, comparados con los promedios encontrados en la subpoblación afectadas de mastitis clínica (tabla 6), presentan diferencias que podrían explicarse como el efecto del ambiente y rasgos fenotípicos de la ubre (Rupp y Boichard, 1999), así como también por la clase de patógeno invasor (Leigh, 1999).

Con relación a los resultados de los promedios de SCS por hatos, se observó que el hato 4 es el de menor promedio de SCS, y el hato 2 el de mayor promedio (tabla 7). El análisis del efecto de la zona de muestreo sobre el SCS, evaluado con el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 1989) fue altamente significativo ($p < 0,001$) para 4 de los 5 hatos, lo que permite concluir que para cada una de las zonas, las actividades relacionadas con la producción, son un factor importante que promueve notables diferencias en la variación de SCS y por consiguiente en la presencia o ausencia de mastitis clínica.

Tabla 7. Promedios de SCS (conteo de células transformado) en cada uno de los hatos evaluados de la población Holstein (Hatos = número de hatos Holstein evaluados; n = número de animales por hato; d. e. = desviación estándar)

Hatos	n	Promedio de SCS (d. e.)
1	45	2,99 (1,12)
2	30	4,04 (1,62)
3	13	3,45 (1,58)
4	21	2,48 (1,41)
5	21	2,81 (0,91)
Total	130	3,14 (1,25)

El resultado de asociación con CATMOD de SAS (SAS Institute, 1989), del alelo BoLA-185 con la enfermedad, presentó un OR inferior a 1, lo que significa que este alelo no se considera como un factor de riesgo para la presencia de la enfermedad (tabla 4). En otras investigaciones previas en ganado Holstein, el alelo *24 (185), ha sido asociado con incremento en el número de neutrófilos (Dietz et al., 1997b), pero no con presencia de mastitis clínica.

Este estudio demostró que BoLA-DRB3 es altamente polimórfico en la raza Holstein de la región

de Antioquia (Colombia), y el alelo BoLA-DRB3-185, presentó una significativa asociación con alto recuento de células somáticas, pero no con la presencia o ausencia de mastitis clínica. Para los demás alelos BoLA-DRB3 encontrados, no se encontró asociación significativa con la presencia de la enfermedad. Nuevos estudios están en proceso, con el propósito de determinar el polimorfismo

de éste *locus* en razas criollas colombianas y su asociación con enfermedades infecciosas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la cooperativa lechera COLANTA el apoyo económico y la asistencia técnica en la toma de muestras.

REFERENCIAS

- Aarestrup FM, Jensen NE.** 1995. Analysis of associations between major histocompatibility complex (BoLA) class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78:1684-1692.
- Acosta-Rodríguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, García-Vásquez Z, Gorodezky C.** 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Veterinary Parasitology*, 127:313-321.
- Ali A, Shook GE.** 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63:487.
- Andersson L, Böhme J, Peterson PA, Rask L.** 1986. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility complex genes: polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Animal Genetics*, 17:296-304.
- Andersson L, Davies CJ.** 1994. The major histocompatibility complex. Pp. 37-57. *En: Goddeeris BML, Morrison WI (eds.). Cell-mediated immunity in ruminants.* CRC Press. Boca Raton, Florida, E. U. A.
- Berryere TG, Muggli-Cockett N, Robins JW, Schmutz SM.** 1994. Molecular studies of DRB relative to *Staphylococcus aureus* mastitis. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production*, 21:187-190.
- Burvenich C, Detilleux J, Paape MJ, Massart-Leen AM.** 2002. Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. *Flemish Veterinary Journal*, 62:95-109.
- Davies CJ, Joosten I, Anderson L.** 1994. Polymorphism of bovine MHC class II genes - Joint report of the Vth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop. Interlaken, Switzerland. 1992. *European Journal of Immunogenetics*, 21:259-289.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME Jr.** 1997a. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80:406-412.
- Dietz AB, Detilleux JC, Freeman AE, Kelly DH, Stabel JR, Kehrli ME Jr.** 1997b. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 80:400-405.
- Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer B.** 1982. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *Journal Food Production*, 45:1125.
- Ellegren H, Davies CJ, Andersson L.** 1993. Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the BoLA-DRB3 gene, implications for microsatellite stability and PCR-based DRB3 typing. *Animal Genetic*, 24:269-275.
- Gill R, Howard WH, Leslie KE, Lissemore K.** 1990. Economics of mastitis control. *Journal Dairy Science*, 73:3340.
- Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen HH, Oliver SP.** 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 82(9):2049-2053.

- Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM.** 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics*, 27:55-56.
- Harmon RJ.** 1994. Symposium: Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 77:2103-2112.
- Kaneene JB, Hurd HS.** 1990. The national animal Health Monitoring System in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 8:127.
- Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrli ME, Dietz AB, Fox LK, Butter JE, Kaskovics I, Kelly DH.** 1997. Genetic association between parameters innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 80:1767-1775.
- Klein J, Figueroa F, Nagy ZA.** 1983. Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. *Annual Reviews Immunology*, 1:119-142.
- Lemeshow S, Hosmer DW.** 1984. Estimating odds ratio with categorically scaled covariates in multiple logistic regression analysis. *American Journal Epidemiology*, 119:147-151.
- Leigh JA.** 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. *Veterinary Journal*, 157:225-238.
- Lewin HA.** 1994. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. *Animal Biotechnology*, 5:183-191.
- Lyons DT, Freeman AE, Kuck A.** 1991. Genetics of health traits in Holstein Cattle. *Journal of Dairy Science*, 74:1092.
- Lunden A, Sigurdardottir S, Edfors-Lilja I, Danell B, Rendel J, Andersson L.** 1990. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Animal Genetics*, 21(3):221-232.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:1215.
- Oddgeirsson O, Simpson SP, Morgan ALG, Ross DS, Spooner RL.** 1988. Relationship between the bovine major histocompatibility complex (BoLA) erythrocyte markers and susceptibility to mastitis. *Animal Genetics*, 19:11-16.
- Raymond M, Rousset F.** 1995. GENEPOP: population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal Heredity*, 86:248-249.
- Ripoli MV, Liron JP, De Luca JC, Rojas F, Dulout FN, Giovambattista G.** 2004. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. *Biochemistry Genetics*, 42:231-240.
- Rupp R, Boichard D.** 1999. Genetics parameters for clinical mastitis. Somatic cell score production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holstein. *Journal of Dairy Science*, 82:2198-2204.
- SAS Institute.** 1989. *Users guide. Version 6.* Cuarta edición. Cary (Carolina del Norte), E. U. A.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JCM, Leslie KE.** 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29:185-193.
- Sharif S, Mallard BA, Sargeant JM.** 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 76:231-238.
- Sigurdardóttir S, Borsch C, Gustafsson K, Andersson L.** 1991. Cloning and sequence-analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 22:199-209.
- Spooner RL, Morgan ALG, Sales D, Simpson SP, Solbu H, Lie O.** 1988. MHC association with mastitis. *Animal Genetics*, 19:57-63.
- Starkenbug RJ, Hansen LB, Kherli ME, Chester-Jones H.** 1997. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holstein in milk selection and control lines. *Journal of Dairy Science*, 80:3411-3419.
- Takeshima S, Nakai Y, Ohta M, Aida Y.** 2002. Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *Journal of Dairy Science*, 85(6):1630-1632.
- Udina IG, Karamysheva EE, Sulimova GE, Pavlenko SP, Turkova SO, Orlova AR, Ernst LK.** 1998. Comparative analysis of Ayrshire and Black Pied cattle breeds by histocompatibility markers. *Genetika*, 34(12):1668-1674.
- Van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA.** 1992. Extensive polymorphism of the BoLa- DrB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23:483-496.