

KAPPA-CASEÍNA BOVINA Y SU ASOCIACIÓN CON EL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN GANADO HOLSTEIN

BOVINE KAPPA-CASEIN AND ITS ASSOCIATION WITH SOMATIC CELL COUNT IN HOLSTEIN CATTLE

José Usme-Ciro¹, Fernando Restrepo² y Esperanza Trujillo-Bravo^{1, 3}

Resumen

Se evaluó la asociación entre los genotipos AA, AB y BB de kappa-caseína (*CSN3*) y el recuento de células somáticas (RCS), al igual que la relación entre la ocurrencia de mastitis clínica recurrente y los diferentes genotipos usando un análisis de correlación simple. Se muestreó un total de 145 vacas de la raza Holstein en diferentes hatos del departamento de Antioquia, Colombia. Se amplificó un fragmento del gen *CSN3* por reacción en cadena de la polimerasa, luego se cortó con la endonucleasa de restricción *Hinf I* y después se visualizó por electroforesis en gel de agarosa. El RCS se clasificó en dos rangos: en el 1 se incluyeron los animales que no excedieron 300×10^3 células/mL; en el 2 se incluyeron los animales con un RCS mayor de 300×10^3 células/mL. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que hay una asociación débil entre el genotipo AA de *CSN3* y el bajo RCS y el genotipo AB y el alto RCS. La asociación es mayor para el genotipo AA que para el AB.

Palabras clave: *CSN3*, análisis factorial, frecuencia alélica, frecuencia genotípica, actividad antimicrobial, leche.

Abstract

It was evaluated the association of genotypes AA, AB and BB of kappa-casein (*CSN3*) and the somatic cells count (SCC), as well as the relation between the occurrence of recurrent clinical mastitis and the genotypes, using a simple correlation. A total of 145 Holstein breed cows were sampled for milk and blood in different farms of department of Antioquia, Colombia. A fragment of the *CSN3* gene was amplified by polymerase chain reaction; then, the amplified fragment was restricted with endonuclease *Hinf I*, and visualized on agarose gel electrophoresis. For the milk samples, the SCC was classified in two ranges: the first included animals which SCC did not exceed 300×10^3 cells/ml, and the second included animals with a SCC higher than 300×10^3 cells/ml. It was detected a weak association between the genotype AA and low SCC, and the genotype AB and the high SCC. This association was higher for the genotype AA than for AB.

Key words: *CSN3*, factorial analysis, allelic frequency, genotypic frequency, antimicrobial activity, milk.

INTRODUCCIÓN

La leche bovina es una mezcla compleja de agua (87,3%), lactosa (4,8%), grasa (3,7%), proteína (3,5%) y otros componentes menores (Jenness, 1974). Aproximadamente el 80% del contenido de proteína son caseínas, α_{s1} -(*CSN1S1*), α_{s2} -(*CSN1S2*), β -(*CSN2*), y κ -caseína (*CSN3*) (Bawden y Nichollas, 1999).

La *CSN3* presenta nueve variantes, de las cuales A y B están asociadas con diferencias en la composición y propiedades tecnológicas de la leche (Dovc, 2000; McLean *et al.*, 1984; Schaar, 1984). Los polimorfismos del gen, que se encuentra mapeado en el cromosoma 6 (BTA 6), residen en el exón IV (Prinzenberg *et al.*, 1996, 1999).

Recibido: octubre de 2003; aceptado para publicación: abril de 2004.

¹ Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, A. A. 1226, Medellín.

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín.

³ Autor para correspondencia: etbravo@epm.net.co, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín, Colombia.

La leche contiene además componentes que proveen importantes elementos nutritivos, sustancias bioactivas, por ejemplo antibacteriales, y de protección inmunológica a neonatos y adultos (Clare y Swaisgood, 2000). El efecto antibacterial en la leche es debido a la suma de las contribuciones individuales de las proteínas de defensa (inmunoglobulinas y no inmunoglobulinas) y a la presencia de péptidos bactericidas formados naturalmente o generados de precursores proteicos inactivos (Clare y Swaisgood, 2000). A la fecha, se han registrado gran cantidad de péptidos derivados de proteínas de la leche con actividad antimicrobial (Bellamy *et al.*, 1994; Clare y Swaisgood, 2000; Lahov, 1971; Lahov y Regelson, 1996; Tomita *et al.*, 1991; Wakabayashi *et al.*, 1996); entre ellos se encuentran Caseidina y Caseinomacropéptido, los cuales se obtienen por digestión con quimosina a pH neutro de *CSN1S1* y *CSN3* respectivamente.

Zucht *et al.* (1995) encontraron que Casocidina-I, derivada de *CSN1S2*, tiene actividad in vitro contra *Staphylococcus carnosus* y *Escherichia coli*; Lahov y Regelson (1996) observaron que Caseidina tiene actividad bactericida in vitro contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*, y que Isracidina, derivada de *CSN1S1*, tiene actividad in vitro contra *S. aureus* y *Candida albicans*. Además, Malkoski *et al.* (2001) obtuvieron evidencia de que Caseinomacropéptido tiene actividad contra los patógenos orales oportunistas *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y contra *E. coli*.

Las células somáticas de la leche son células epiteliales producto de la descamación y células blancas, que incluyen macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos (Harmon, 1994). El incremento de células somáticas, durante la infección de la glándula mamaria, es debido al aumento de PMN (Craven y Williams, 1985; Harmon y Heald, 1982; Harmon y Langlois, 1986; Miller y Paape, 1985; Nickerson y Pankey, 1984; Paape *et al.*, 1979). El rango de variación va desde 100.000 células/mL en animales sanos, hasta valores superiores a 1.500.000 células/mL en animales con inflamación (Eberhart *et al.*, 1982). La

respuesta inflamatoria, producto de la infección, difiere de acuerdo con la especie bacteriana infectante (Ward y Shultz, 1972).

Se ha determinado en investigaciones previas, que el RCS puede estar influenciado por marcadores ubicados en los cromosomas 1, 5, 7, 18, 21, 22, 23 y 26 (Heyen *et al.*, 1998, 1999; Kalm *et al.*, 1998; Owen *et al.*, 2000).

El propósito de este trabajo fue determinar la asociación entre los genotipos AA, AB y BB de *CSN3* bovina, el RCS, y la frecuencia de mastitis clínica, en animales de la raza Holstein.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra poblacional. Se estudiaron 145 hembras de ganado Holstein, provenientes de hatos ubicados en zonas lecheras de Antioquia. Para garantizar la clasificación fenotípica correcta, las vacas se agruparon en dos categorías: una con diagnóstico previo y recurrente de mastitis clínica y otra con diagnóstico previo negativo de mastitis.

Recuento de células somáticas. Por cada animal se fijaron en KCr_2O_7 15 mL de leche, con el objetivo de efectuar posteriormente el recuento electrónico de las células somáticas (RCS), utilizando un contador Fossomatic 215 (Foss Electric, 3400 Hillerod, Denmark). Debido al gran rango de variación que presentan, los valores de RCS se transformaron mediante la ecuación: $\text{Log}_2(\text{RCS}/10^5) + 3$ (Ali y Shook, 1980), con lo cual se consiguió una distribución cercana a la normal y se pudieron hacer los análisis estadísticos.

Los animales se clasificaron en dos rangos: en el 1 se incluyeron animales con valores de RCS iguales o menores a 300×10^3 células/mL ($\text{SCS} \leq 4,58$) y en el 2 se incluyeron animales con valores mayores a 300×10^3 células/mL ($\text{SCS} > 4,58$).

Extracción de ADN. De cada animal se colectaron aproximadamente 7 mL de sangre de la vena mamaria o arteria coccígea media. La sangre total se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento. El ADN se extrajo por la metodología de "salting

out" (Miller *et al.*, 1988) y precipitación con 2-propanol. La concentración del ADN se midió por espectrofotometría a 260 nm.

Amplificación del ADN. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ L, los cuales contenían: 1,0 μ L de DNA (0,7 μ g/mL); 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 0,1% Tritón[®] X-100; 1,5 mM de MgCl₂; 80 μ M de cada dNTP; 12,5 pmol de cada primer y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega Corporation, Madison, WI 53711-5399, USA). La amplificación se efectuó en un termociclador T-Personal 48 (Biometra[®] GmbH, D-37079 Goettingen, Germany) El fragmento de ADN se amplificó con los iniciadores de reacción hacia adelante: JK-5 5'-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3' y hacia atrás: JK-3 5'-AGACAATGTCTCTTC-CGCTTTACCCG-3' (Medrano y Aguilar-Córdova, 1990, Número de acceso GenBank: X14908). Los iniciadores específicos fueron fabricados por IDT (Coralville, IA 52241, USA).

El perfil térmico consistió en: un ciclo a 97 °C por 2 min, 65 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; la extensión final se hizo a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR (5 μ L del total de la muestra) fueron visualizados mediante electroforesis a 60 V por 20 min en geles de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio (0,7 μ g/mL).

Digestión con la endonucleasa de restricción (RFLP). Los fragmentos de ADN, amplificados por PCR, fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Hinf I* (MBI Fermentas, Hanover, MD 21076, USA). Para la reacción se utilizaron 10 μ L del producto de la PCR y 5 unidades de la enzima. Las muestras fueron digeridas a 37 °C durante 4 horas en un volumen final de 20 μ L.

Electroforesis en geles de agarosa. Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa NuSieve[®] al 3% (FMC BioProducts, Rockland, ME 04841, USA) con solución amortiguadora TBE 1X (8,9 mM Tris-HCl, 8,9 mM ácido bórico, 0,25 mM EDTA, pH 8,3).

Los geles fueron corridos a 60 V por 20 min. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por medio de un transiluminador de luz UV (Upland, CA 91786, USA).

Métodos estadísticos. Para detectar desviaciones significativas de las proporciones genotípicas observadas y esperadas, se llevó a cabo la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, siguiendo el proceso descrito por Guo y Thompson (1992), en el cual se usa la prueba análoga de Fisher y una tabla de contingencia de dos por dos. Este análisis se efectuó con el paquete computacional GENEPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995).

También se llevó a cabo un análisis factorial de correspondencia simple entre las frecuencias genotípicas detectadas y los valores de RCS transformados, considerándolas variables cualitativas. Las variables se representaron en un plano factorial para evaluar similitudes y disimilitudes entre ellas. Este análisis se ejecutó con el programa computacional SPADN versión 3.0 (CISIA, 1995).

RESULTADOS

A partir de la digestión del segmento amplificado del gen *CSN3* se obtuvo fragmentos de 134, 132 y 84 pares de bases (pb) del alelo A y de 226 y 84 pb del alelo B; resultado similar al obtenido por Medrano y Aguilar-Córdova (1990).

La frecuencia del alelo A fue de 0,817 y la del alelo B de 0,183. Las frecuencias genotípicas de AA, AB y BB fueron 0,662, 0,310 y 0,028, respectivamente. La población total se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,1$) (tabla 1).

Un total de 74 hembras presentaron diagnóstico previo y recurrente de mastitis clínica (afectadas), de éstas, 12 se ubicaron en el rango 1, siendo 8 de genotipo AA, 4 AB y ninguna de BB. Las 62 restantes se ubicaron en el rango 2, de las cuales 35 presentaron genotipo AA, 26 AB y 1 BB.

Un total de 71 hembras presentaron diagnóstico negativo de mastitis, de éstas 42 se encontraron en el rango 1; siendo 32 genotipo AA, 10 AB y 1 BB.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas para el locus *CSN3* en ganado Holstein

Genotipo	Número observado de vacas	Frecuencias genotípicas observadas	Número esperado de vacas	Frecuencias genotípicas esperadas	Frecuencias alélicas
AA	96	0,662	96,768	0,668	A = 0,817
AB	45	0,310	43,464	0,299	B = 0,183
BB	4	0,028	4,768	0,033	
Total	145	1,000	145,000	1,000	

Las 26 restantes se ubicaron en el rango 2, de las cuales 21 fueron genotipo AA, 5 genotipo AB y 2 BB.

Las frecuencias de los genotipos AA, AB y BB con respecto a la incidencia o no de mastitis y teniendo en cuenta los rangos establecidos se describen en la tabla 2.

En el análisis factorial de correspondencia simple, la ubicación de las variables sobre el plano factorial, permite observar que el genotipo AA tiende a agruparse con el rango 1 y el genotipo AB con el rango 2 (figura).

DISCUSIÓN

Van Eenennaan y Medrano (1991) demostraron que en animales heterocigóticos, el alelo B de *CSN3* determina la mayor cantidad del total de kappa-caseína presente en la leche. Heringstad et al. (1999), encontraron, mediante análisis bivariado, una correlación genética de 0,25 entre mastitis clínica y producción de proteína. Ambos

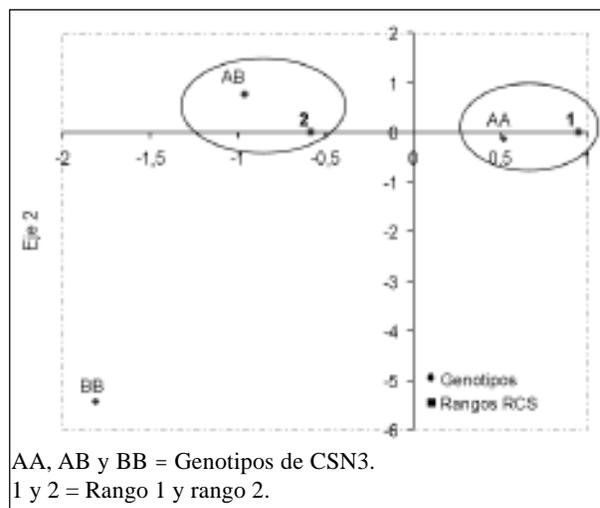
Tabla 2. Genotipos de *CSN3* y relación con la incidencia de mastitis clínica y rangos de células somáticas

Genotipo	Rango 1		Rango 2	
	Frecuencia de vacas afectadas	Frecuencia de vacas normales	Frecuencia de vacas afectadas	Frecuencia de vacas normales
AA	0,08	0,33	0,37	0,22
AB	0,09	0,22	0,58	0,11
BB	0,00	0,25	0,25	0,50

AA, AB y BB = Genotipos de *CSN3*.

Rango 1 = RCS ≤ 4,58.

Rango 2 = RCS > 4,58.



AA, AB y BB = Genotipos de *CSN3*.
1 y 2 = Rango 1 y rango 2.

Figura. Plano factorial de correspondencia simple

efectos, son determinados por diferencias en la expresión de los alelos A y B (Lapointe et al., 2002). Tal variación, puede estar determinando una diferencia entre animales de genotipo AA con relación a animales de genotipo AB. En este sentido, el análisis de los resultados presentados en la tabla 2 para el rango 1, muestra que los animales normales con genotipo AA se presentaron con una frecuencia mucho más alta que animales afectados. Lo mismo sucede en este mismo rango para animales normales AB.

Para el rango 2, las frecuencias de hembras afectadas y normales de genotipo AA presentaron valores que no difieren en gran medida, por lo cual podemos inferir que el incremento de células somáticas se dio de manera similar en hembras con mastitis y en hembras normales. El genotipo AB presentó mayor frecuencia de animales con la enfermedad, respecto a los normales. Este resultado podría sugerir que dentro del rango 2 el grupo de hembras que más frecuentemente sufren la enfermedad son las de genotipo AB.

La distribución de las frecuencias de animales afectados y sanos portando el genotipo BB es probablemente producto del azar, como consecuencia del pequeño tamaño de la población BB.

Los animales agrupados en el rango 2, presentaron mastitis más frecuentemente que los del ran-

go 1. Este resultado está de acuerdo con estudios recientes (Peeler *et al.*, 2002), donde se estableció que la incidencia de mastitis clínica disminuyó significativamente cuando se presentaron valores bajos de RCS en animales de razas británicas. Además, confirma investigaciones previas (Eberhart *et al.*, 1982, Dabdoud, 1984), donde se correlacionó el recuento de células somáticas con la mastitis clínica.

En el plano factorial de correspondencia simple (figura), se observa una asociación entre el genotipo AA y el bajo RCS y del genotipo AB y el alto RCS, lo que sugiere que los genotipos AA y AB podrían estar relacionados con un posible efecto sobre el RCS. La tendencia de asociación entre el genotipo BB y el RCS no se evidenció en la población analizada, debido posiblemente al bajo número de animales detectados de este genotipo.

La asociación de bajo RCS con el genotipo AA es de importancia, teniendo en cuenta que la mas-

titis es el factor que afecta en mayor medida el RCS (Harmon, 1994) y que frecuentemente se recurre a este valor para evaluar el estado de salud de la ubre y seleccionar animales con baja incidencia de mastitis (Schutz *et al.*, 1994). La tendencia de asociación del genotipo AA con un bajo RCS está en concordancia con los resultados de Malkoski *et al.* (2001) quienes encontraron mayor actividad antimicrobial del Caseinomacropéptido originado de CSN3, en los derivados de la variante A.

AGRADECIMIENTOS

A la Cooperativa Lechera COLANTA, por el soporte financiero y la asistencia técnica en la colección de las muestras y al Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

- Ali AKA, Shook GE.** 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *J Dairy Sci* 63:487.
- Bawden WS, Nicholas KR.** 1999. Molecular genetics of milk production. En: Fries R, Ruvinsky A (eds.). *The Genetics of Cattle*. Wallingford, CAB International, pp. 539-576.
- Bellamy WR, Yamauchi K, Wakabayashi H, Takase M, Shimamura S, Tomita M.** 1994. Antifungal properties of lactoferricin, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett Appl Microbiol* 18:230-233.
- CISIA –Centre International de Statistique et d’Informatique Appliquées–.** 1995. SPADN version 3.0. Saint-Mandé, France.
- Clare DA, Swaisgood HE.** 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J Dairy Sci* 83:1187-1195.
- Craven N, Williams MR.** 1985. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol* 10:71-127.
- Dabdoub SAM.** 1984. Genetics and phenotypic relationship among mastitis, Somatic Cell concentration and milk yield. Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin, Madison.
- Dovc P.** 2000. Genetic polymorphisms in milk protein genes and their impact on milk composition. *Adv Exp Med Biol* 480:225-230.
- Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer SB.** 1982. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *J Food Protect* 45:1125-1128.
- Guo SW, Thompson EA.** 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion of multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Harmon RJ.** 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* 77:2103-2112.
- Harmon RJ, Heald CW.** 1982. Migration of polymorphonuclear leucocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am J Vet Res* 43:992-998.
- Harmon RJ, Langlois BE.** 1986. Prevalence of minor pathogens and associated somatic cell counts. *Proc 25th Annu Mtg Natl Mastitis Counc Columbus, OH*. Natl Mastitis Counc Inc, Arlington, VA, p. 11.
- Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J.** 1999. Clinical mastitis in Norwegian cattle: frequency, variance components, and genetic correlation with protein yield. *J Dairy Sci* 82:1325-1330.
- Heyen DW, Weller JI, Ron M, Band M, Feldmesser E, Da Y, Wiggans GR, Vanraden PM, Lewin HA.** 1998. Genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Proc XXVth Int Conf Anim Genet, 9-14 August, 1998*, Auckland, New Zealand, p. E006.
- Heyen DW, Weller JI, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, Da Y, Wiggans GR, Vanraden PM, Lewin HA.** 1999. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics* 1:165-175.
- Jenness R.** 1974. Caseins and caseinate micelles of various species. *Neth Milk Dairy J* 27:251-257.
- Kalm E, Reinsch N, Xu H, Thomsen H, Looft C, Grupe S, Brockmann G, Kühnn C, Schwerin M, Leyle B, Hiendleder S, Erhardt G, Medjgorac I, Russ I, Förster M, Brenig B, Reinhard F, Reets R, Averdunk G.** 1998. Mapping QTL on cattle chromosome 2, 5, 10, 16, 18 and 23. *Anim Genet* 21(supl. 1):62.

- Lahov E, Edelsten D, Sode-Mogensen MT, Sofer E.** 1971. Properties of basic glycopeptides from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft* 26:489-495.
- Lahov E, Regelson W.** 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol* 34:131-145.
- Lapointe G, Robitaille G, Britten M, Morisset J, Pouliot Y, Petitclerc D.** 2002. Influence of a differential allelic expression of bovine kappa-casein gene on micelle properties and renneting parameters. *J Dairy Sci* 85(supl 1):377.
- Malkoski M, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Talbo GH, Macris M, Cross KJ, Reynolds EC.** 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2309-2315.
- McLean DM, Graham ER, Ponzoni RW, Mckenzie HA.** 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J Dairy Res* 51:531-546.
- Medrano JF, Aguilar-Córdova E.** 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnol* 8:144-146.
- Miller RH, Paape MJ.** 1985. Relationship between milk somatic cell count and milk yield. *Proc 24th Annu Mtg Natl Mastitis Counc, Reno, NV*, Natl Mastitis Counc, Inc, Arlington, VA, p. 60.
- Miller SA, Dykes DD, Poletsky HF.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16:1215.
- Nickerson SC, Pankey JW.** 1984. Neutrophil migration through teat end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* 67:826-834.
- Owen JB, Axford RFE, Bishop SC.** 2000. Mastitis in dairy cattle. *En: Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB (eds.). Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Wallingford, CAB International, pp. 243-252.
- Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ.** 1979. Leukocytes-second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 62:135-153.
- Peeler EJ, Green MJ, Fitzpatrick JL, Green LE.** 2002. Study of clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell counts less than 150,000 cells/mL. *Vet Rec* 151:170-176.
- Prinzenberg EM, Hiendleder S, Ikonen T, Erhardt G.** 1996. Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles CSN3F and CSN3G and genotyping by PCR-RFLP. *Anim Genet* 27:347-349.
- Prinzenberg EM, Krause I, Erhardt G.** 1999. SSCP analysis at the bovine *CSN3* locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). *Anim Biotechnol* 10:49-62.
- Raymond M, Rousset F.** 1995. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86:248-249.
- Schaar J.** 1984. Effects of kappa-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milks. *J Dairy Res* 51:397-406.
- Schutz MM, Vanraden PM, Wiggins GR.** 1994. Genetic variation in lactation means of somatic cell scores for six breeds of dairy cattle. *J Dairy Sci* 77:284-293.
- Tomita M, Bellamy WR, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K.** 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* 74:4137-4142.
- Van Eenennaam AL, Medrano JF.** 1991. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous kappa-casein cows. *J Dairy Sci* 74:1491-1496.
- Wakabayashi H, Abe S, Okutomi T, Tansho S, Kawase K, Amaguchi H.** 1996. Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiol Immunol* 40:821-825.
- Ward GE, Schultz LH.** 1972. Relationships of somatic cells quarter milk to type of bacteria and production. *J Dairy Sci* 55:1428-1431.
- Zucht HD, Raida M, Adermann K, Marget HJ, Forssman WG.** 1995. Casocidin-I: a casein- α_2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett* 372:185-188.