

INVESTIGACIÓN

DETECCIÓN DE UN DEFECTO GENÉTICO EN BOVINOS MEDIANTE UNA PRUEBA DE ADN¹

Detection of a bovine genetic defect by a DNA probe

Ricardo Felmer D.², Norberto Butendieck B.²,
Bárbara Butendieck B.² y Juana Villegas M.³

A B S T R A C T

The adhesion deficiency of bovine leukocytes to antigens, known as BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency), is a hereditary genetic disease which is lethal for the Holstein breed. It is a recessive autosomal disease that can be transmitted to the offspring. The objective of this research was to standardize the molecular techniques to diagnose BLAD and also to get a first approximation of the genetic frequency of the mutated allele in the bull population of the IX and X Regions. DNA amplification using polymerase chain reaction (PCR) and posterior digestion with restriction enzymes *Taq* I and *Hae* III was performed. The digested product was analyzed by 4% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining to show the typical restriction fragments present in normal, carrier and infected cattle. The technique was validated with a screening test of 59 cattle. Out of 55 bulls analyzed, one turned out to be a BLAD carrier, which suggests a genetic frequency of 1.79% in the bull population of the IXth and Xth Regions. The diagnostic technique of PCR and the digestion of the amplification product with two restriction enzymes (*Taq* I and *Hae* III) has identified with accuracy the genotype of cattle at a specific locus and allows an early identification of the genetic defect known as BLAD in infected and carrier animals.

Key words: bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD, PCR, Holstein breed, RFLP, disease.

R E S U M E N

La deficiencia en la capacidad de unión de leucocitos bovinos a los antígenos, más conocida como BLAD, es una enfermedad hereditaria que resulta letal para el ganado de la raza Holstein. Su principal característica es ser una enfermedad autosómica recesiva que puede ser transmitida a la descendencia. El objetivo del trabajo fue estandarizar la metodología para realizar un diagnóstico de la enfermedad mediante técnicas moleculares y lograr una primera aproximación sobre la frecuencia génica del alelo mutado en algunas poblaciones de toros de la IX y X Región. En base a la amplificación del ADN mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y posterior digestión con enzimas de restricción *Taq* I y *Hae* III, fue posible visualizar, mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%, los fragmentos de restricción característicos para bovinos normales, portadores o enfermos. La técnica se validó mediante un muestreo de 59 bovinos. De los 55 toros analizados uno resultó ser portador de BLAD, lo que implica una frecuencia génica de 1,79% en la población de

¹Recepción de originales: 11 de marzo de 1999.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.
E-mail: nbutendi@carillanca.inia.cl

³Universidad de La Frontera, Departamento de Medicina Interna, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

toros de la IX y X Región. La técnica de PCR acoplada a la digestión con enzimas de restricción (*Hae* III y *Taq* I) ha demostrado que identifica inequívocamente el genotipo del ganado en un locus determinado y permite el diagnóstico certero y precoz de aquellos animales enfermos y/o portadores del defecto hereditario conocido como BLAD.

Palabras clave: deficiencia de adhesión leucocitaria bovina, BLAD, PCR, RFLP, Holstein, enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Una granulocitopatía bovina, conocida actualmente como BLAD (Bovine leucocyte adhesion deficiency o deficiencia de adhesión leucocitaria bovina) fue descrita por primera vez en una vaquilla Holstein Friesian por Hagemoser *et al.* (1983) en EE.UU. Esta patología se caracterizó por una susceptibilidad aumentada a la acción de agentes infecciosos durante los dos años de vida del animal. Estos autores documentaron en el animal estudiado una función alterada de los neutrófilos. Pese a una alta neutrofilia era incapaz de iniciar una respuesta inflamatoria. Posteriormente Nagahata *et al.* (1987) describieron en Japón una enfermedad similar, caracterizada por un síndrome granulocitopático, que afectó a terneros y vaquillas Holstein Friesian descendientes de ganado proveniente de EE.UU. Takahashi *et al.* (1987), en base a un análisis de pedigrí, sugirieron como causa del síndrome granulocitopático una enfermedad con un mecanismo de transmisión hereditario de tipo recesivo autosomal simple.

En 1990 Kehrli *et al.* definieron la base molecular de la granulocitopatía bovina como una deficiencia del complejo glicoproteína Mac-1 (CD11b/CD18). Dentro de las manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio de la enfermedad se pueden señalar: a) infecciones recurrentes de tejidos blandos, como estomatitis granulomatosa y ulcerativa, enteritis, neumonitis, periodontitis; b) cicatrización defectuosa; c) muerte temprana; d) leucocitosis donde predominan los neutrófilos; neutrofilia persistente y progresiva; linfocitosis moderada; e) neutrófilos fun-

cionalmente anormales en cuanto a motilidad, fagocitosis y capacidad oxidativa. A la necropsia se observan numerosos neutrófilos en capilares sinusoides y vasos sanguíneos, contrastando con el bajo número de neutrófilos extravasculares en los tejidos inflamados y en los que se puede observar sobrecrecimiento de microorganismos. Las lesiones histopatológicas más frecuentemente registradas son enteritis necrótica, hiperplasia linfoide e histiocitosis de los ganglios linfáticos. En muchos casos el examen histológico confirmó lesiones macroscópicas de neumonía o abscesos pulmonares. También se han diagnosticado laringitis y traqueitis así como hiperplasia mieloide de la médula ósea (Gilbert *et al.*, 1993).

El BLAD es una enfermedad hereditaria que resulta letal para el ganado de la raza Holstein (Kehrli *et al.*, 1992). Una enfermedad equivalente existe en el humano denominada "deficiencia de adhesión leucocitaria humana" (LAD), así como en perros de la raza Setter Irlandés, que presentan una deficiencia genética en las glicoproteínas LFA-1, Mac-1 y p150,95, denominadas también CD11/CD18 por la Organización Mundial de la Salud. Shuster *et al.* (1992) secuenciaron el gen normal para la proteína bovina CD18, que codifica para la subunidad β de las integrinas, e identificaron el alelo bovino CD18 defectuoso. Se trata de 2 mutaciones puntuales dentro del alelo que codifica CD18 en el bovino. Una es silenciosa y la segunda mutación consiste en el cambio de ácido aspártico por glicina en el aminoácido 128, que corresponde a la región extracelular, altamente conservada, tanto en el humano, bovino y ratón. La mu-

tación genética afecta la función de un receptor de proteínas en los leucocitos. Las reacciones de adherencia leucocitaria son importantes en la respuesta inflamatoria y en la defensa del organismo contra infecciones. En esta función participan las $\beta 2$ integrinas, una familia de glicoproteínas integrales de la membrana de los leucocitos constituida por la subunidad α (CD11a, CD11b y CD11c) y β (CD18) y que se agrupan en: -CD11a CD18 (LFA-1), receptor para ICAM-1 en el endotelio vascular; -CD11b CD18 (Mac-1), receptor para C3bi (fagocitosis opsónica); -CD11c CD18 (p150, 95), receptor para C3bi y fibrinógeno.

Cuando un bovino es afectado por una infección, los leucocitos son atraídos al tejido afectado y combaten a los microorganismos invasores. Los leucocitos son atraídos al sitio de la infección por moléculas que aparecen en las paredes de los vasos sanguíneos de la zona afectada. Para poder penetrar al tejido infectado los leucocitos usan uno de sus receptores para adherirse a estas moléculas y fijarse a ellas, para poder atravesar la pared vascular y llegar al tejido infectado. La mutación asociada al BLAD modifica el receptor de los leucocitos, de modo que pierden su capacidad de fijarse a las paredes vasculares para llegar al tejido infectado. Como consecuencia, los bovinos afectados no pueden combatir enfermedades bacterianas comunes, las cuales pueden persistir o recurrir. Su principal característica es ser una enfermedad autosómica recesiva y por tanto capaz de transmitirse desde padres portadores a su descendencia. Los terneros afectados sufren de infecciones recurrentes especialmente de los tejidos blandos (enteritis, neumonitis, periodontitis, etc.), los cuales ya sea fallan en la respuesta a la infección o recaen luego de un tratamiento convencional, muriendo normalmente antes de alcanzar la madurez sexual.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) acoplada a la digestión con enzimas de restricción (RFLP) ha demostrado que identifica inequívocamente el

genotipo del ganado en un *locus* determinado (Kehrli *et al.*, 1990; Shuster *et al.*, 1992; Tammen *et al.*, 1996; Felmer y Butendieck, 1996).

El objetivo del presente trabajo tiene por finalidad estandarizar la metodología de Walsh *et al.* (1991) y Tammen *et al.* (1996), para realizar un diagnóstico certero y precoz de aquellos animales enfermos y/o portadores del defecto hereditario conocido como BLAD, y establecer una primera aproximación de la frecuencia génica del alelo mutado en la población de reproductores bovinos producidos por criaderos de la IX y X Región.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de sangre de 37 toros de la raza Frisón Negro Chileno y de 3 vacas de la misma raza, cuyos pedigríes permitían sospechar la presencia de ejemplares portadores de esta enfermedad, en atención a que eran descendientes de toros pertenecientes a centros de inseminación, que posteriormente se identificaron en los correspondientes catálogos como portadores de BLAD. Todos estos animales pertenecían al Centro Regional de Investigación (CRI) Carillanca, ubicado en el valle central de la IX Región, comuna de Vilcún, distante 20 km de Temuco. Además, se utilizaron 19 muestras de sangre de toros seleccionados para ser evaluados para inseminación artificial, representativos de algunos criaderos ubicados en la IX y X Región. La obtención de las muestras de sangre se realizó de acuerdo a métodos convencionales de extracción (5 a 10 mL por animal), usando como anticoagulante 1,5 mg mL⁻¹ EDTA-potásico.

b) Extracción de ADN

El aislamiento y purificación de ADN a partir de sangre total se realizó de acuerdo al método descrito por Winberg (1991), el cual rinde ADN en cantidad y calidad suficientes para la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Este fue el

procedimiento de extracción utilizado inicialmente y aplicado a las tres vacas. En los toros se utilizó un método alternativo de extracción de ADN a partir de sangre total, el cual no requiere de extensas etapas de purificación, descrito por Walsh *et al.* (1991), en el cual se aprovecha la capacidad quelante que tiene la resina Chelex-100 para extraer ADN desde células sanguíneas. La diferencia fundamental con el método descrito por Walsh *et al.* (1991) radica en la separación previa de los leucocitos de la sangre mediante lisis selectiva de los eritrocitos y separación de los leucocitos mediante centrifugación.

c) Amplificación de ADN *in vitro*

En base a la secuencia del ADNc del gen C18 del bovino (M81233, número de acceso de la base de datos GenBank) se sintetizaron (Centro de Síntesis de Oligonucleótidos) y utilizaron los oligonucleótidos o partidores descritos por Tammen *et al.* (1996), (5'-GTCAGGCAGTTGCGTTCAA-3') y (5'-GAGGTCATCCACCA TcGAGT-3'). Este último presenta un cambio en una base, por lo cual introduce en el producto de amplificación, un nuevo sitio de restricción para la enzima *Taq* I, con lo cual se obtiene un producto de amplificación de 101 pb de dicho gen. La reacción estándar de PCR para un volumen final de 30 μL^{-1} contiene: 1X de Tampón de PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 y 25 mM MgCl_2), 100 μM de cada dNTP, 0,75 U de *Taq* ADN Polimerasa (Gibco BRL), 0,2 μM de cada partidor, 30 ng de ADN y H_2O desionizada estéril hasta completar volumen. Las muestras se amplificaron en un Termociclador Perkin-Elmer 9700. El perfil termal utilizado corresponde básicamente al método descrito por Tammen *et al.* (1996), modificado en los ciclos y temperaturas en atención a los resultados obtenidos. Los valores indicados por Tammen *et al.* (1996) se señalan entre paréntesis. Se inicia la reacción con la desnaturalización a 94 °C/5 min, seguida de 10 ciclos, donde cada ciclo consta de la desnaturalización a 94 °C durante 30 s, la fase de hibridación a 60 °C (56 °C) durante 60 s y la fase de extensión a 72 °C durante 30 s, seguidos de

27 (25) ciclos a 90 °C/30 s, 60 °C (56 °C)/60 s, 72 °C/30 s, para finalizar con una extensión de 72 °C/5 min.

d) Digestión del producto amplificado

Para diferenciar las variantes alélicas se utilizaron dos endonucleasas de restricción. Para ello se tomaron del producto de amplificación 10 μL que fueron transferidos a dos tubos sometidos a reacción, adicionando en un tubo 5 U de *Hae* III y en el otro 5 U de *Taq* I (Gibco BRL) y 10% del volumen final de reacción del tampón 10X React 2 de Gibco BRL (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; 1 mM DTT) a cada uno de ellos. Se continuó con la incubación de 1 h a 37 °C para *Hae* III y a 65 °C para *Taq* I (Tammen *et al.*, 1996). La reacción se detuvo agregando 1 μL de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilen cianol, 30% de glicerol) y tampón TAE 6X. La identificación del genotipo para cada muestra se realizó por visualización de las bandas de ADN producidas después de la digestión del producto amplificado y la separación de ellas mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% (Nusieve GTG, FMC), en tampón TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M pH 8,0 y EDTA 1 mM), con un voltaje de 2,5 V cm^{-1} durante 2 h (Figura 1). Finalmente los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se fotografiaron en un transiluminador UV.

e) Frecuencias génicas y genotípicas

Las frecuencias génicas y genotípicas se calcularon de acuerdo a Li (1968).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación del alelo mutado versus el alelo normal (genotipo del animal en estudio) para el *locus* CD18, responsable de la enfermedad genética conocida como BLAD, se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 101 pb del gen CD18 y posterior digestión del fragmento amplificado por las enzi-

mas de restricción *Taq I* y *Hae III* (Figura 2) (Shuster *et al.*, 1992; Tammen *et al.*, 1996).

En el Cuadro 1 se indica el tamaño en pares de bases que deben tener los fragmentos de restricción en bovinos normales, portadores y enfermos de BLAD. Los fragmentos de ADN generados a partir de la digestión se distinguieron claramente luego de la electroforesis en agarosa al 4% (Figura 1). La metodología descrita y probada demostró ser efectiva para identificar el alelo mutado del locus CD18, conforme a lo descrito por Kehrl *et al.* (1990) y Shuster *et al.* (1992). De esta forma es factible separar a aquellos individuos portadores evitando así que se continúe con la transmisión de esta deficiencia genética en la progenie.

Los resultados que se muestran en el Cuadro 2 establecen, que de los 56 toros analizados, uno

resultó ser portador de esta deficiencia genética. En cambio, de las 3 vacas sospechosas, se determinó que dos de ellas eran portadoras del alelo mutado. No se consideraron las vacas en el cálculo de la frecuencia génica por ser un número no significativo y pertenecer a un solo predio.

El análisis de los datos aportados por los 56 toros permite señalar que la frecuencia genotípica de los toros portadores de la enfermedad, en los criaderos de la IX y X Región, es del 1,79%, y la frecuencia génica o alélica del alelo mutado un 0,89%. La frecuencia genotípica de los portadores es inferior al 14,1% señalado por Shuster *et al.* (1992) para EE.UU. La diferencia puede deberse a que la frecuencia alélica observada en el sur de Chile involucra sólo una pequeña parte de los reproductores machos usados en Chile, aquellos provenientes de criaderos e inscritos en los registros genealógicos, y no a la

Cuadro 1. Patrón de las bandas de los fragmentos de restricción (pb) posterior a la digestión con enzimas *Taq I* y *Hae III*

Table 1. Banding pattern of the restriction fragments (bp) after enzyme digestion with *Taq I* and *Hae III*

Producto de PCR	<i>Taq I</i>			<i>Hae III</i>		
	TL	BL	BLAD	TL	BL	BLAD
101		84	84	65	65	
	52	52			46	46
	32	32		36	36	36
	17	17	17		19	19

TL= Normal; BL= Heterocigoto (portador); BLAD= Homocigoto (enfermo).

Cuadro 2. Screening de animales para la enfermedad genética BLAD (deficiencia de adhesión de leucocitos bovinos)

Table 2. Screening results of the tested cattle for BLAD (bovine leucocyte adhesion deficiency)

	TL	BLAD	BL	TOTAL
Vacas sospechosas	1	0	2	3
Toros Frisón Negro Carillanca	37	0	0	37
Toros Frisón Negro IX y X Región	18	0	1	19

TL= Normal; BLAD= Homocigoto (enfermo); BL= Heterocigoto (portador).

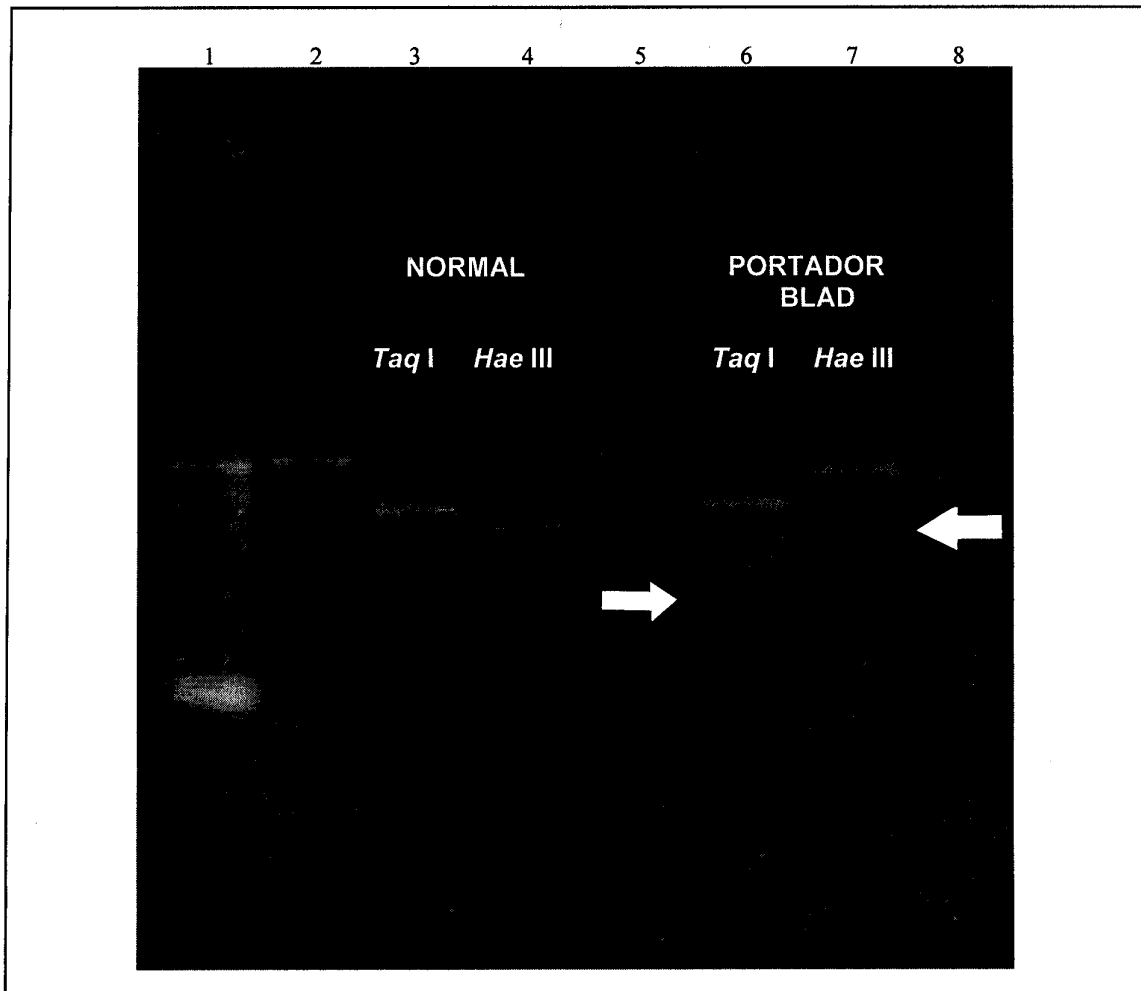


Figura 1. Electroforesis sobre un gel de agarosa al 4%, que muestra el patrón de migración del ADN amplificado de un bovino normal y de uno portador de BLAD, después de una digestión con enzimas de restricción. En el carril 1 estándar de tamaño molecular escalera de ADN de 10 pb. Carril 2, producto de amplificación sin digerir. Carril 3 y 4, fragmentos de restricción obtenidos con *Hae* III y *Taq* I del alelo normal respectivamente. Carril 5, producto de amplificación sin digerir. Carril 6 y 7, fragmentos de restricción obtenidos con *Hae* III y *Taq* I del alelo mutado, respectivamente. Carril 8, control negativo. Las flechas indican la aparición de bandas anormales que permiten reconocer un animal portador.

Figure 1. Electrophoresis using 4% agarose gel that shows the migration pattern of amplified DNA from a normal bovine and a BLAD carrier bovine following digestion with restriction enzymes. Band 1, 10 bp DNA ladder molecular size standard. Band 2, PCR product without digestion. Bands 3 and 4, restriction fragments of the normal allele obtained with *Hae* III and *Taq* I, respectively. Band 5, PCR product without digestion. Band 6 and 7, restriction fragments of the mutated allele obtained with *Hae* III and *Taq* I, respectively. Lane 8, negative control. The arrows indicate abnormal bands, which permit the identification of a carrier animal.

masa total de reproductores usados en ambas regiones, ya que no puede descartarse absolutamente que se haya podido producir una mutación del gen CD18 en alguno de los reproductores nacionales usados en algún momento. Por otra

parte, la introducción de la raza Holstein en el sur de Chile es muy posterior a la de la aparición de la mutación en EE.UU., por lo cual el gen no tuvo igual cantidad de tiempo para difundirse antes de que se conociera la enfermedad. En

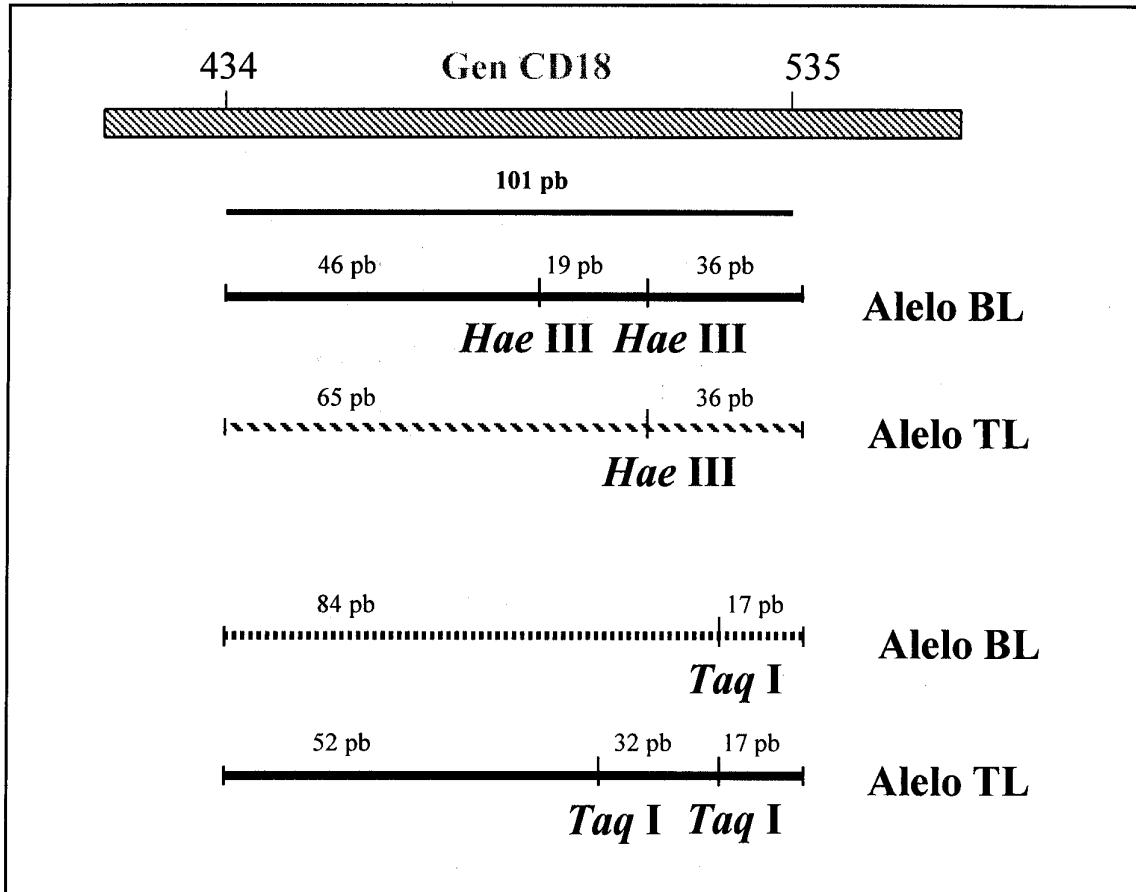


Figura 2. ADN amplificado y efecto de la digestión con enzimas de restricción, que permiten visualizar 3 fragmentos de restricción de 52, 32 y 17 pb obtenidos con *Taq* I y dos fragmentos de restricción de 65 y 36 pb obtenidos con *Hae* III en el alelo normal, respectivamente. En el alelo mutado se observan dos fragmentos de restricción de 84 y 17 pb obtenidos con *Taq* I y tres fragmentos de restricción de 46, 19 y 36 pb obtenidos con *Hae* III, respectivamente. TL = alelo normal, BL = alelo mutado a BLAD (Shuster *et al.*, 1992; Tammen *et al.*, 1996).

Figure 2. Amplified DNA and effect of digestion with restriction enzymes that display three restriction fragments of 52, 32 and 17 pb obtained with *Taq* I and two restriction fragments of 65 and 36 pb obtained with *Hae* III of the normal allele, respectively. In the mutated allele, two restriction fragments with 84 and 17 pb were obtained with *Taq* I and three restriction fragments of 46, 19 and 35 pb with *Hae* III, respectively. TL = normal allele, BL = mutated allele (BLAD) (Shuster *et al.*, 1992, Tammen *et al.*, 1996).

atención a que la raza Holstein existe en la zona central de Chile desde el siglo pasado, y como raza posee registros genealógicos desde 1946, es posible suponer que la frecuencia génica y de portadores puede ser mucho mayor en la zona central de Chile que en la IX y X Región.

La razón por la cual no se encontraron toros portadores del gen en el Criadero Carillanca se

debe a la selección realizada contra la posible presencia del alelo recesivo en vacas madres de futuros toros. Sin embargo, el hecho de haberse vendido en Chile semen de toros portadores de BLAD, antes de que fuera conocida su condición de tal, determina que el alelo mutado esté presente en la población bovina del país, aunque su frecuencia aparentemente es baja, al menos en la IX y X Región. Actualmente es posible en-

contrar en catálogos de inseminación semen de toros portadores de BLAD, los cuales están relacionados con un ancestro común, el toro Osborndale Ivanhoe, nacido en 1952. Ello se debe a que este toro y toros portadores posteriores, han sido todos de alto mérito genético, por lo cual pueden ser interesantes para cruzamientos específicos, cuando se conoce la condición genética de las hembras a inseminar. En Chile se prohibió el ingreso de semen de toros portadores, no obstante es importante tipificar para el gen del BLAD aquellos reproductores de origen nacional, con el fin que la frecuencia génica disminuya en la población bovina. De ahí la importancia de disponer en Chile de las técnicas moleculares para identificar esta enfermedad.

CONCLUSIONES

La utilización de pruebas de ADN en base a la técnica descrita, es efectiva para identificar individuos portadores heterocigotos y animales enfermos homocigotos para la deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD). Si bien la frecuencia del alelo es aparentemente baja, la aplicación de esta metodología adquiere real importancia, especialmente en la determinación de aquellos individuos portadores antes de que ingresen a un programa de inseminación artificial, y permite además diagnosticar y confirmar a aquellos individuos que presentan una sintomatología clínica que pudiera hacer sospechar la presencia de esta enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Felmer, R., and N. Butendieck. 1996. Genotyping a bovine milk protein using allele discrimination by PCR technology. Abstract 601. *In* VIII Panamerican Biochemistry and Molecular Biology Congress (PABMB), Pucón, Chile. 16-21 noviembre. *Noticiero de Biología*.
- Gilbert, R.O., W.C. Rebhun, C.A. Kim, M.E. Kehrli, D.E. Schuster, and M.R. Ackermann. 1993. Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle: 14 cases (1977-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:445-449.
- Hagemoser, W.A., J.A. Roth, J. Löfsted, and J.A. Fagerland. 1983. Granulocytopenia in a Holstein heifer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:1093-1094.
- Kehrli, M.E., C. Schmalstieg, D.C. Anderson, M.J. Van Der Maaten, B.J. Hughes, M.R. Ackermann, C.L. Wilhemsen, G.B. Brown, M.G. Stevens, and C.A. Whetstone. 1990. Molecular definition of the bovine granulocytopenia syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.* 51:1826-1836.
- Kehrli, M.E., D.E. Shuster, and M.R. Ackermann. 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Veterinarian* 82:103-109.
- Li, C.C. 1968. *Population Genetics*. p. 1-22. 1st ed. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Nagahata, H., H. Noda, K. Takahashi, T. Kurosawa, and M. Sonoda. 1987. Bovine granulocytopenia syndrome. Neutrophil dysfunction in Holstein Friesian calves. *Zentralbl. für Veterinärmedizin. J. Vet. Med.* 34:445-451.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Herlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Shuster, D.E., M.E. Kehrli, M.R. Ackermann, and R.O. Gilbert. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9225-9229.
- Takahashi, K., K. Miyagawa, S. Abe, T. Kurosawa, M. Sonoda, T. Nakade, H. Nagahata, H. Noda, Y. Chihaya, and E. Isogai. 1987. Bovine granulocytopenia syndrome of Holstein Friesian calves and heifers. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49:733-736.

- Tammen, I., H. Klippert, A. Kuczka, A. Treviranus, J. Pohlenz, M. Stober, D. Simon, and B. Harlizius. 1996. An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Res. Vet. Sci.* 60:218-221.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Winberg, G. 1991. A rapid method for preparing DNA from blood, suited for PCR screening of transgenes in mice. *PCR Methods Appl.* 1:72-74.