

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN YERLİ SIĞIRLAR VE MELEZLERİNDE TLR 1, TLR 4, TLR 9, BOIFNG VE SLC11A1 GEN POLİMORFİZMLERİ İLE BRUCELLA VE TUBERKÜLOZ HASTALIKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No: TCD-2014-5449

Proje Türü

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Bilal AKYÜZ

Veteriner Fakültesi/Genetik ABD

Araştırmacının Adı Soyadı

Mehmet Ulaş ÇINAR-Ziraat Fakültesi/Zootekni Bölümü

Korhan ARSLAN-Veteriner Fakültesi/ Genetik ABD

Esma Gamze İLGAR-Veteriner Fakültesi/ Genetik ABD

Aralık 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırma projesi olarak yürütülen bu çalışmada araştırma konusunun belirlenmesinde ve konunun planlanıp yürütülmesinde emek veren çok değerli proje ekibine, çalışmanın mikrobiyolojik analizlerini yapan sayın Prof. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY'a

Araştırmayı TCD-2014-5449 nolu projenin destekleyerek maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Birim Çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Mart 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
ÖZET	6
ABSTRACT	8
1. GİRİŞ	10
2. MATERYAL ve YÖNTEM	19
2.1 Hayvan Materyali	19
2.2. Serolojik Analizler	19
2.2.1. Brusella (<i>Brucella</i> -Ab C-ELISA) ELISA'nın Yapılışı	20
2.2.2. Tüberküloz Gamma İnterferon ELISA'nın Yapılışı	20
2.2.3. Tüberküloz Antikor (MBAb) ELISA'nın Yapılışı	21
2.3. Örneklerin Dört Gen Yönünden Genotiplendirilmesi	21
2.3.1. Toll like reseptör 1 (TLR 1) Gen Polimorfizmleri	21
2.3.1.1. TLR1 +1380 G/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	21
2.3.1.2. TLR1 +1446 C/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	22
2.3.1.3. TLR1- G1596A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	22
2.3.2. Toll like reseptör 4 (TLR 4) Gen Polimorfizmleri	23
2.3.2.1. TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	23
2.3.2.2. TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	24
2.3.3. Toll like reseptör 9 (TLR 9) Gen Polimorfizmleri	24
2.3.3.1. TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	24
2.3.3.2. TLR9-A2700G tek nokta polimorfizminin belirlenmesi	25
2.3.4. Solute Carrier Family 11, Member 1 (SLC11A1) Gen Polimorfizminin Belirlenmesi	25
2.3.5. Sığır IFNG Geninin 1. Eksonunda Bulunan 2781G/T Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi	26
2.3.6. Myeloid Differentiation Primary Response 88 (Myd88) Geninin 1. Eksonunda Bulunan (A625C) Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi	26
2.4. İstatistik Analiz	26
3. BULGULAR	27
3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	27

3.2. Serolojik Analizler	27
3.2.1. Brusella (<i>Brucella</i> -Ab C-ELISA) ELISA Sonuçları	27
3.2.2. Tüberküloz Gamma İnterferon ELISA Sonuçları	27
3.2.3. Tüberküloz Antikor ELISA Sonuçları	27
3.3. Örneklerin Altı Gen Yönünden Genotiplendirilmesi	28
3.3.1 Toll like reseptör 1 (TLR 1) Gen Polimorfizm Sonuçları	28
3.3.1.1. TLR1 +1380 G/A tek nokta polimorfizmi	28
3.3.1.2. TLR1 +1446 C/A tek nokta polimorfizmi	29
3.3.1.3. TLR1- G1596A tek nokta polimorfizmi	30
3.3.2. Toll like reseptör 4 (TLR 4) Gen Polimorfizm Sonuçları	31
3.3.2.1. TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizmi	31
3.3.2.2. TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizmi	33
3.3.3. Toll like reseptör 9 (TLR 9) Gen Polimorfizm Sonuçları	34
3.3.3.1. TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizmi	34
3.3.3.2. TLR9-A2700G tek nokta polimorfizmi	35
3.3.4. Solute Carrier Family 11, Member 1 (SLC11A1) +1066 C/G Tek Nokta Polimorfizm Sonuçları	35
3.3.5. Sığır IFNG (BoIFNG) Geninin 1. Eksonunda Bulunan 2781G/T Tek Nokta Polimorfizm Sonuçları	37
3.3.6. Sığır Myd88 Myeloid Differentiation Primary Response (88) Geninin 1. Eksonunda Bulunan (A625C) Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi	38
3.4. Genotipler-Fenotip (Tüberküloz ve Brusella Antikor Seviyeleri) İlişkileri	38
3.5. Tüberküloz ve brucella hastalıkları ile genotipler arasındaki ilişkinin araştırılması	42
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
4.1. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi	45
4.2. TLR1, TLR4, TLR9 ve SLC11A1 Genotip-Allel Frekansları, Genotip-Fenotip İlişkileri	46
4.2.1. TLR1 +1380 G/A	46
4.2.2. TLR1 +1446 C/A	47
4.2.3. TLR1 1596 G/A	48
4.2.4. TLR4 +10 C/T	49
4.2.5. TLR4 +399 C/T	50
4.2.6. TLR9 +1310 G/A	50
4.2.7. SLC11A1 +1066 C/G	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
6. KAYNAKLAR	52

ÖZET

Mycobacterium bovis'in sebep olduğu sığır tüberkülozu, tüm dünyada özellikle süt sığır yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olan kronik ve zoonotik bir hastalıktır. Hastalık çoğunlukla solunum yolu ile enfekte damlacıkların solunması ile bulaşır. Ancak sindirim yoluyla da bulaşma olabilir. Etken akciğer ulaştığında ürer ve öncelikle akciğer lenf düğümlerine yayılır. Hastalık lezyonları tüm vucutta görülebilir. Ancak lezyonlar çoğunlukla baş ve thoraks lenf yumruları ile akciğerler, bağırsaklar, karaciğer, dalak, pleura ve peritonda görülür. Hastalığın ortaya çıkması, alınan bakteri miktarı, bakterinin virulensi ve konakçının doğal bağışıklığına bağlıdır.

Brucella cinsine bağlı hücre içi patojenlerin sebep olduğu brucella hastalığı global ölçekte önem taşıyan çok önemli bir zoonoz hastalıktır. Sığırlarda görülen brucella hastalığı manda, at, koyun, keçi ve insanda da hastalığa sebep olan *Brucella abortus*'tur. Hasta ineklerde, süt veriminde azalma, sütteki somatik hücre sayısında artma, ileri gebelikte abort, zayıf buzağı doğumu ve postpartum metritis gibi klinik belirtiler görülür. Boğalarda ise epididymitis ve vesiculitis görülür. Daha önce enfeksiyon etkenleri ile karşılaşmamış sığırlarda hastalığın ortaya çıkmamasında konakçının doğal bağışıklığının önemli olduğu bildirilmektedir.

Toll benzeri reseptörler (Toll-Like Receptors, TLR) doğal bağışıklık sisteminin bir patojenle karşılaştığında immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynayan protein tabiatlı reseptörlerdir. Bu reseptörlerin aynı zamanda kazanılmış bağışıklığın aktif hale gelmesinde de görevleri vardır. Fagozom membranı üzerinde bulunan solute carrier family 11 member A1 (SLC11A1) proteinleri, makrofajların hücre içi bakterilerin yok edilmesinde görev alan önemli proteinlerdir.

Yapılan bu çalışmada Holstein (n=100) ve yerli melezi (n=400) sığırlarda TLR ailesinden TLR1, TLR4 ve TLR9 ile SLC11A1'yı kodlayan genlerde bulunan sekiz tek nokta polimorfizmi (SNP) yönünden genotipleri, fenol-korofom yöntemi ile yapılan DNA izolasyonunu yakiben yapılan PCR-RFLP yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen SNP verileriyle sığırlarda görülen tüberküloz ve brusella hastalığına dayanıklılık arasında ki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmada incelenen polimorfizmlerden TLR4 +399 yönünden hem Holsteinlerin (HL) hemde Doğu Anadolu melezleri (DM) ile Yerli Kara melezlerinin (YM) monomorfik olduğu

ve incelenen örneklerin hepsinin CC genotipinde olduğu görülmüştür. TLR4 +10 SNP'si yönünden incelenen bireylerde TT, TLR9 +1310 SNP'si yönünden ise AA genotipi her üç ırkta da görülmemiştir.

Tüberküloz hastalığı ile genotipler arasındaki ilişki Lojistik Regresyon Analizi ile araştırılmıştır. Incelenen ırklarda, TLR1 (+1380, +1446, +1596), TLR4 (+10), TLR9 (+1310) SNP'lerinde tüberküloz görülme oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak SLCA11A1 (+1066) SNP'si açısından yapılan değerlendirme sonucunda, tüberküloz görülme oranının YK ve DAK melezi gruplarındaki genotipler arasında istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar göre DAK melezi sığırlarda tüberküloz görülme oranının; GG genotipine göre CC ve CG genotiplerinde sırasıyla 4,13 ve 3,51 kat arttığı görülmüşken, YK melezi sığırlarda tüberküloz görülme oranının; GG genotipine göre CC ve CG genotiplerinde sırasıyla 0,8 ve 0,34 kat daha düşük olduğu görülmüştür.

Brucella hastalığı ile incelenen SNP'ler arasında ilişki belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: Brusella, RFLP, Sığır, SLC11A1, Toll-like reseptör, Tüberküloz

ABSTRACT

Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis*, is a chronic and zoonotic disease that causes serious economic loss especially in dairy cattle breeding worldwide. Transmission of tuberculosis is mostly thought to respiratory tract, but transmission can also be through the digestive tract by infected milk and feed and it can be transplacental infection. When the tubercle agent reaches the lung, it grows and it spreads to the lung lymph nodes first. Disease lesions can be seen throughout the body. However, lesions are mostly seen in the head and thorax lymph nodes and in the lungs, intestines, liver, spleen, pleura, and peritoneum. The amount of bacteria taken, the virulence of the bacterium and the natural immunity of the host are important in the emergence of the disease.

Brucella disease caused by an intracellular pathogen is a very important zoonotic disease of global importance. *Brucella abortus* is caused by brucellosis in cattle and this agent also causes brucellosis in water buffalo, horse, goat, sheep and human. In cattle, brucellosis is featured with characteristic clinical symptoms such as decrease milk yield, increase somatic cell score in milk, abort last periods in pregnancy, weak calf birth and postpartum metritis. Epididymitis and vesiculitis occur in infected bulls. It has been reported that the innate immunity of the host is important in the absence of disease in previously unexposed cattle.

Toll-Like Receptors (TLR) are protein natured receptors that have important role during the first step of immunological response between the pathogens and innate immune system. These receptors also have the task of activating the adaptive immunity. Solute carrier family 11 member A1 (SLC11A1) proteins are found on the phagosomal membrane. And they task the destruction of intracellular bacteria in macrophages.

In this project, slaughtered at abattoir cattle 400 native crossbreed cattle and 100 Holstein cattle were used as materials. The eight polymorphisms of TLR1, TLR4, TLR9 and SLC11A1 genes were to be determined by PCR-RFLP method using of DNA isolated from the same animals. The relationship between the obtained SNPs data and the resistance to tuberculosis and brucella diseases seen in cattle was investigated.

TLR4 +399 SNP was monomorphic in examined three breeds, and only CC genotype was observed both of Holstein and native crossbreeds. In two groups of the breeds examined for TLR4 +10 C/T SNP, TT genotype has not been seen. In addition, for TLR9 +1310 G/A SNP, AA genotype was not found both of Holstein (HL) breed, East Anatolian crossbreeds (DM) and Anatolian Black crossbreeds (YM).

The statistical analysis between genotypes and tuberculosis incidence was made by establishing a Logistic Regression Model. There was no statistically significant difference in the incidence of tuberculosis in the SNPs of TLR1 (1380, 1446, 1596), TLR4 (10), TLR9 (1310). However, in terms of SLCA11A1 (1066) SNP, incidences of tuberculosis were found to be statistically different according to the genotypes in AB crossbreed and EAR crossbreeds. As a result, incidence of tuberculosis in EAR crossbreed cattle; according to the GG genotype, CC and CG genotype were found 4.13 and 3.51 fold higher respectively. The incidence of tuberculosis in AB crossbreed cattle; according to the GG genotype, CC and CG genotype were found 0.8 and 0.34 fold lesser respectively.

No relationship was found between Brucella disease and the examined SNPs.

Key Words: Brucella, Cattle, RFLP, SLC11A1, Toll-like receptor, Tuberculosis,

1. GİRİŞ

Genetik ve çevresel faktörler hayvan yetiştiriciliğinde içinde hastalıklara direncinde bulunduğu önemli kantitatif karakterlerin ortaya çıkmasında önemli etkileri bulunmaktadır. Dolayısıyla eldeki sürünün yetiştiricilik açısından önemli verim özellikleri bakımından karakterizasyonunun yapılması karlı bir yetiştiricilik için önemlidir. Son yıllarda tüm dünyada ki çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde markır destekli seleksiyon ve genomik seleksiyon çalışmalarında bir artış görülmektedir. Bu tür çalışmalarda öncelik küresel olarak en yaygın yetiştiriciliği yapılan ırklara verilmesine rağmen lokal ırklarda da bu tür çalışmalar giderek artmaktadır.

İlk olarak 1958 yılında devlet eliyle düve ve boğa ithalatı ile Türkiye’de Holstein yetiştiriciliğine başlandıktan sonra ithalata 1970 yılına kadar ara verilmiştir (Alpan, 1993). Bu tarihten sonra gerek Tarım Bakanlığı, gerekse yetiştiriciler tarafından günümüze kadar değişik Avrupa ve Amerika’dan canlı Holstein veya sperma ithal edilmektedir. Türkiye’de saf ve melez olarak yetiştirilen Holstein ırkı, bugün Türkiye’de ki en önemli sığır ırkı olmuştur. Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği’nin 2015 yılı verilerine göre Türkiye’deki kültür ırklarının yaklaşık %72’sini (Şahin, 2015), Türkiye İstatistik Kurmu’nun 2016 verilerine göre ise Türkiye mevcut sığır varlığının yaklaşık %46’sını (TÜİK, 2017) Holstein ırkı sığır oluşturmaktadır

Artan insan nüfusunun ihtiyacının karşılanmasında yerli ırkların yetersiz kalması, ihtiyaç duyulan hayvansal kökenli gıdanın temininde yetersiz kalan düşük verimli yerli çiftlik hayvanları ırklarının yetiştirme dışı kalmasına neden olmuştur. Bu durum ise en önemli tür içi genetik çeşitlilik kaynağı olan yerli ırkların yol olmasına sebep olmaktadır. Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), yetiştiriciliği yapılan tüm çiftlik hayvanı türlerine ait toplam 5865 farklı ırkın bulunduğu ve bunlarında yaklaşık 300’ünün 2000 yılına kadar soyunun tükendiğini ve mevcut durumun devam etmesi halinde ise önümüzdeki yüzyıl sonunda 1350 ırkın daha yok olacağını bildirilmiştir. Buna karşılık FAO tarafından, yaşadıkları bölgelerin iklim ve florasına karşı gösterdikleri yüksek adaptasyon ve hastalıklara direnç nedeniyle mevcut yerli ırkların korunmasının, türün geleceği için önemli olacağı bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2005). FAO verilerine göre bilinen 1392 sığır ırkında 182’sinin soyu tükenmiştir (FAO, 2012). Bu süreç ülkemiz yerli sığır ırkları içinde hızla işlemektedir. Çünkü Türkiye yerli sığır ırklarının varlığı TÜİK verilerine göre 2000 yılında 4.217.000 baş iken bu sayı 2016 yılında 1.733.292 başa düşmüştür (TÜİK, 2017).

Günümüzde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan kültür ırkı hayvanlar yüksek verim yönünden geliştirilmiş ırklardır. Ancak bu ırklar, orijinlerinden çok farklı iklim ve coğrafyalarda yetiştirilmektedir. Bu durumda kültür ırklarının yetiştirildikleri yeni yerlerde bulunan hastalık etmelerine, bakım ve iklim şartlarına karşı duyarlılıklarını artırarak gerek verim düşüklüğü gerekse tedavi masrafları nedeniyle işletmelerin karlılığının düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle ortaya çıkmasında ve varlığını sürdürmesinde herhangi bir planlı seleksiyona tabi tutulmayan yerli çiftlik hayvanı ırkları özgün gen kaynağı olmaları bakımından, varlıklarını sürdürmeleri türlerin gelecekleri için önemlidirler. Asya, Afrika ve Avrupa arasında köprü olan Anadolu yarım adası bitki ve hayvan türleri bakımından oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Ancak yapılan ıslah ve melezleme çalışmaları ve yüksek verimleri nedeniyle yetiştirici tarafından talep edilen kültür ırklarının yaygınlaşması sonucu eldeki genetik kaynaklar tam tanımlanamadan ve üstün özellikleri belirlenemeden, soyları tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadırlar.

Avrupa orijili kültür ırkı hayvanların ıslahı çalışmaları, bu ırkların ortaya çıktıkları veya benzer iklim şartlarına sahip bölgelerde yapılması nedeniyle öncelik verim artışına verilmiştir. Ancak günümüzde ciddi verim düşüklüklerine neden olarak işletmerde önemli ekonomik kayıplara neden olan brusella ve tüberküloz gibi önemli yetiştiricilik hastalıklarına karşı direncin genetik alt yapısı ve bu hastalıklara dirençli ırk ve tiplerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ilgi giderek artmaktadır.

Günümüz hayvancılık sektöründe düşük maliyetli üretim için hastalıklara direnç artık aranan bir özelliktir (Gibson ve Bishop, 2005). Özellikle bulaşıcı hastalıklara direnç karlı hayvancılık sistemlerinin sürdürülebilirliği için çok önemlidir ve eldeki sürünün ekonomik kayba neden olan önemli enfeksiyon hastalıklarına karşı direncinin artırılması artık seleksiyon programlarının birincil hedefi olmaya başlamıştır (Gibson ve Bishop, 2005). Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde enfeksiyöz hastalıkların kontrolünde, hasta hayvanlarda antibakteriyel ve antihelmintik ilaçların kullanılması, hayvanların hastalıktan korunması için aşılama, barınakları ve çevreni dezenfeksiyonu, hasta hayvanları izolasyonu hastalığın görüldüğü yerlerde hayvan ve haysansal ürünlerin dolaşımının kısıtlanması gibi dört önemli tedbir alınır. Ancak çiftlik hayvanlarının hastalıklara karşı dirençlerinin genetik olarak artırılması giderek yukarıdaki dört maddeye ek olarak etkili hastalık kontrolü çalışmalarının tamamlayıcı ve hatta hastalıkların kontrolü çalışmalarının asıl bileşeni olmaya başlamıştır (Gibson ve Bishop, 2005).

Yapılan alışmalar hemen her hastalık için direnç veya duyarlılığın, konakçının genetik yapısı ile ilişkili olduğu gstemiştir (Gibson ve Bishop, 2005). Ancak bu konu henüz tam açıklığa kavuşmamıştır. Bununla beraber önemli çiftlik hayvanı türlerinde görülen 50’den fazla enfeksiyöz hastalığın ortaya çıkmasında ki farklılığın konakılardaki genetik varyasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (Bishop, 2004). Bunların içerisinde en bilinenlerinden bazıları, tavuklarda Marek hastalığına dayanıklılık, ruminatlarda görülen dermatofiloz, nematod, mastitis ve taileriosis’e dayanıklılıktır. Özellikle sığırlarda genetik ıslah çalışmaları ile dermatofiloza dayanıklı hatların geliştirilmesi konusunda önemli başarı elde edilmiştir (Maillard ve ark., 2003).

Genetik olarak hastalıklara drencin artırılması ile hedef popülasyonda hastalıkların klinik semptomlarının veya hastalık insidensini azaltabilecektir (Gibson ve Bishop, 2005). İlk olarak 1970’lerde varlıları bildirilen ve çiftlik hayvanlarında önemli kantitatif özelliklerin iyileştirilmesi çalışmalarında kullanılan genetik belirteçlerin çiftlik hayvanlarında hastalıkları direnç konusunda da kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla özellikle 1980 ve 1990’larda yapılan çalışmalarda çiftlik hayvanlarında belirlenen kantitatif özellik lokusu (QTL) ile ilişkili genetik markırlar belirlenmiştir. Günümüzde bu genetik markırların genetik iyileştirme programlarında nasıl kullanılacağına dair çalışmalar yapılmakta ve bu belirteçlerle ilişkili QTL’lerin kullanıldığı genetik iyileştirme programları gelişmiş ülkelerde bir kaç türde kullanılmaktadır (Gibson ve Bishop, 2005).

Yüksek kalıtım derecesine sahip özellikler için fenotip kayıtlarının kullanıldığı seleksiyon yöntemleri ile hedeflenen genetik ilerleme sağlanabilir. Ancak iftlik hayvanlarında hastalıklara direncinde dahil olduğu birçok kantitatif özelliğin fenotip kayıtlarının tutulması çok zordur, süt ve dl verimi gibi bir kısım özelliğin ortaya çıkmasında genotip ve evre birlikte rol alır. Bu nedenle kantitatif karakterler için fenotip verileri ile kullanılarak yapılacak seleksiyon çalışmalarında çok düşük bir genetik ilerleme sağlanabilir. Bu tür özellikler için belirteç seleksiyon ve genomik seleksiyon yöntemlerinin kullanılması düşünülmektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların sayısı henüz yetersizdir. Dolayısıyla daha çok çalışmanın yapılması gereklidir

Günümüz iftlik hayvanları yetiştiriciliğinde verimi daha da artırma yerine hastalıklara dirençli bireylerin damızlık olarak seçilmesinin daha önemli olmaktadır (Steininger ve ark., 2012). Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde yüksek gelir (bunun için daha yüksek et ve süt üretimi) ve düşük masraf (bunun için yüksek dl verimi, daha az hastalık ve dolayısıyla daha az zorunlu kesim) nemlidir (Egger-Danner ve ark., 2015). Bu nedenle özellikle süt sığırı

yetiştiriciliğinde süt verimini artırmanın iyileştirilmek istenen en önemli özellik olmadığı, bunun yanında yüksek döl verimine sahip ve sağlıklı dolayısıyla da işletmelerde daha uzun süre kullanılabilen hayvanları damızlık olarak seçme eğiliminde oldukları görülmektedir (Egger-Danner ve ark., 2015).

Brusella ve tüberküloz gibi hastalıkların hayvancılık işletmelerinde verim kayıplarına neden olması ve damızlıkların damızlık değerini kaybetmeleri nedeniyle sürü büyüklüğünü tehlikeye atarak işletmelere önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde hastalıklara direnç çok önemli bir kantitatif özelliktir (Martínez ve ark., 2010). Görülme sıklığı çok yaygın olan hastalıklara dayanıklılık ve bağışıklıkta görülen genetik varyasyon önemli bir faktör olmakla birlikte, bu varyasyonun kaynağının sadece dirençten mi? yoksa sadece bireysel dayanıklılıktan mı? yoksa her ikisinin de birlikte rol aldığı bir durum olduğu henüz aydınlatılamamış bir konudur (Martínez ve ark., 2010).

Hastalıklara direnç konusunda yapılacak bir genetik ıslah programına başlanmadan önce; üzerinde durulan hastalığa karşı genetik direnç yönünden yapılacak genetik ıslahın başarısının tahmini, hastalıklara direnç ile ilgili olduğu düşünülen lokuslarda gerek ırk içi gerekse ırklar arası genetik varyasyonun bulunması, yaygın görülmeyen, önemli ekonomik kayba neden olmayan hastalıklar uğraşılması için yapılacak ıslah çalışması sonucunda elde edilecek genetik iyileşmenin net ekonomik ve sosyal faydalarının hesaplanmasıdır (Gibson ve Bishop, 2005).

Brusella ve tüberküloz gibi çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olması yanında çok önemli halk sağlığı problemi olan hastalıkların kontrol altına alınmasında kullanılan mevcut yöntemler; terapötik veya profilaktik ilaçlarla aşılama, sürülerin taranmasına, enfekte hayvanların itlafı, enfekte hayvanın bulunduğu işletmelerin karantinaya alınması, hayvan ve veya hayvansal ürünlerin hareketlerinin kontrolü üzerine kurulmuştur. Fakat bu tür uygulamaların, üretim maliyetinin artması, antibiyotiğe karşı dirençli suşların ortaya çıkması, damızlıkların elden çıkması gibi önemli dezavantajları vardır. Bu nedenle tüberküloz ve brucella gibi hastalıklara karşı genetik olarak dirençli ırk veya tiplerin geliştirilmesi bu sorunların ortadan kaldırılmasında önemli bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Prakash ve ark., 2014). Genetik direnç; patojene maruz kalmadan etkene karşı gösterdiği bağışıklık olarak tanımlanabilir ve doğal bağışıklık olarak da adlandırılır (Adams ve Schutta, 2010). Moleküler genetik alanında elde edilen gelişmeler sonunda, çiftlik hayvanlarında genetik dizileme ve genlerin genetik haritaları çıkarılmış ve bu sayde immün sistem ile ilişkili bazı genetik markırlar belirlenmiştir (Prakash ve ark., 2014).

Brucellozis, *Brucella* cinsine ait intrasellüler bir patojenin sebep olduğu kronik bir zoonoz hastalıktır (İça ve ark., 2012). Hastalık etkeni özellikle uterus, meme ve testis gibi genital organlara yerleşerek yavru atma, infertilite ve süt veriminde azalmaya neden olur (Al Dahouk ve ark., 2003). Sığır brucellozisinin en önemli etkeni olan *Brucella abortus* sığırlar dışında manda, deve, geyik, at, keçi, koyun ve insanda da hastalığa sebep olur. Brusellozis sığırlarda süt veriminde düşme, sütteki somatik hücre sayısında artış, gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde abort, boğalarda orşitise sebep olur. Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde sağaltımın ekonomik olmaması ve hastalık taşıyıcısı olmaları nedeniyle hastalıkla en iyi mücadele taşıyıcı hayvanların kesime sevk edilmesidir. Sığırlarda *brucella* enfeksiyonuna çoğunlukla *B. abortus* neden olurken, daha az sıklıkla *B. melitensis* ve çok nadir olarak da *B. suis*'in neden olduğu bildirilmektedir (Pehlivanoğlu ve ark., 2011).

Dünya genelinde en önemli bakteriyel zoonoz hastalıklardan biri olan brusellozis özellikle gelişmekte olan ülkelerde çok önemli ekonomik zararlara neden olan hem hayvan sağlığı hemde insan sağlığı için önemli problemler oluşturur (Pappas ve ark., 2006; Franco ve ark., 2007). Veteriner hekimlik ve insan hekimliğinde oluşturduğu tehditlerin yanında; tedavi, iş kaybı, hasta havanlardan elde edilen ürün kaybı, işçilik giderleri de düşünüldüğünde dünya genelinde çok büyük ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Prakash ve ark., 2014). Tüm dünyada her yıl 500 binden fazla yeni *brucella* vakası bildirilmektedir (Pappas ve ark., 2006). Türkiye'de ise 2000 yılında yapılan bir çalışmada ülke genelinde yetiştirilen süt sığırlarında *brucella* prevalansının %11.4 olduğu bildirilmiştir (İyisan ve ark., 2000). Buna karşılık daha yakın yıllarda yapılan çalışmalar sonunda hastalığın prevalansına yönelik yapılan çalışmalar sonunda Kırıkkale ve civarında %19 (Öcal ve ark., 2008), Kayseri ve civarında %15 (Hodul ve Gümüşsoy, 2009), Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde ise %39,45 (Şahin ve ark., 2008) oranında seropozitiflik elde edildiği bildirilmiştir.

Bakteriyolojik olarak birbirine yakın ve DNA'lar birbirine benzeyen bir grup *Mycobacterium* türünün bir grubu *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) kompleks olarak adlandırılır (Hussain, 2007). Bu gruptaki mikroorganizmalar özellikle insan ve çiftlik hayvanları olmak üzere memelilerde kronik granülamatöz bir hastalık olan tüberküloza sebep olurlar. Bu kompleksin *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. bovis* BCG (Behr, 2001), *M. canetti* (van Soolingen ve ark., 1997) ve *M. caprae* (Aranaz ve ark., 1999) en bilinen üyeleridir. Bunlardan da *M. bovis* insanlar da dahil olmak üzere bir çok memeliyi enfekte edebilen en yagın konakçı dağılımına sahip türüdür (O'Reilly ve arek., 1995).

Sığırlarda tüberküloz çoğunlukla *M. bovis* solunum yolu ile bulaşması ile ortaya çıkar. Ancak etken ile kontamine olmuş yem ve suyun ağız yoluyla alınmasıyla da materyalin enfeksiyon oluşabilir. Etken akciğere ulaştığında çoğalarak akciğer lenf yumruları ve yakındaki lenf yumrularına yerleşir (Menzies ve Neill, 2000). Hastalık canlı sığırlarda genellikle bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu olan tüberkülin testi ile teşhis edilir (Özbey ve ark., 2008). Hasta hayvanların otopsisinde veya kesimde tüberkel olarak da bilinen nodüler granülomlar görülür (Özbey ve ark., 2008). Genel olarak kronik bir hastalık olarak bilinen sığır tüberkülozunun akut olarak da seyredebileceği bildirilmektedir. Hastalıkla ilgili lezyonlar tüm doku ve organlarda görülebilir ancak en çok lenf yumruları (öncelikle akciğerlere yakın baş ve göğüs lenf yumruları), akciğerler, bağırsaklar, karaciğer ve dalakta görülür (Özbey ve ark., 2008).

Hastalığın eradike edilmesinde sıkı tedbirlerin alınması ve hasta hayvanların itlafi gereklidir. Buna rağmen Dünya'nın bir çok ülkesinde hala hastalık eradike edilememiş dünya genelinde bir sağlık problemidir (Finlay ve ark., 2012). Öyleki bir ada ülkesi olması nedeniyle havan giriş çıkışının kontrollü olduğu İngiltere de bile tüberküloz, insidensi yaklaşık %29,2 olan endemik enfeksiyöz bir hastalıktır. Bir çok ülkede hastalık sığır yetiştiriciliği için çok önemli ekonomik kayıplara neden olması yanında önemli bir halk sağlığı tehdididir (Sun ve ark., 2012). İnsanlarda görülen tüberküloz vakalarına çoğunlukla *Mycobacterium tuberculosis* sebep olmasına rağmen insanlarda *Mycobacterium bovis*'de tüberkülozun gelişmesine neden olmaktadır (Ameni ve ark., 2007). Dünya genelinde çiftlik hayvanlarında görülen en önemli dördüncü hastalık olan sığır tüberkülozunun dünya genelinde yıllık yaklaşık üç milyar dolar kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Garnier ve ark., 2003). Son yıllarda tüberküloz hastalığının prevelansı ile bazı genlerdeki varyasyonlar arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Ameni ve ark., 2007). Ayrıca ilkel bir sığır türü olan *Bos indicus*'ların (zebu) *Bos taurus*'lara (gerçek sığır) göre daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Ameni ve ark., 2007). Bu durumda gerçek sığırın ilkel örnekleri olan ve üzerlerinde herhangi bir planlı seleksiyon çalışması yapılmamış olan yerli sığır ırklarının, yüksek verimli kültür ırklarına göre tüberküloz hastalığına daha dirençli oldukları düşünülmektedir (Prakash ve ark., 2014).

Memelilerde bağışıklık doğal ve kazanılmış bağışıklık olarak ikiye ayrılır (Prakash ve ark., 2014). Toll-like reseptörleri (TLR) hem enfeksiyon ajanlarına karşı kazanılmış immun yanıtın başlatılmasında hemde doğal immun yanıtın oluşmasında kritik rol üstlenirler (Takeda ve ark., 2003). Tüm memelilerde doğal bağışıklık sisteminin enfeksiyon etkenlerini tanımasında toll like reseptör ailesi görevlidir (Akira ve Takeda, 2004). TLR'ler memelilerde bağışıklık

sisteminin ilk aşamasında patojeni tanıma rol oynarlar. Mikroorganizmaların hücre duvarlarında Patojen İlişkili Moleküler Kalıplar (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) olarak adlandırılan yapılar bulunmaktadır (Medzhitov ve Janeway, 1997). Doğal bağışıklıkta mikroorganizmalar hücre duvarlarında bulunan PAMPs, konakçı organizmanın makrofaj hücre zarlarında bulunan TLR'ler aracılığı ile tanınırlar. TLR kimyasal bir dizi reaksiyonu tetikleyerek makrofajların aktive olmasını sağlarlar. Bu sayede enfeksiyon başlangıç aşamasında makrofajlar tarafından mikroorganizmalar yok edilir. Kazanılmış bağışıklıkta ise uyarılan TLR'ler, dendritik hücrelerin aktivasyonunu başlatarak, T-hücre aktivasyonunu tetikler (Rescigno ve ark., 2000; Akira ve Takeda, 2004). Trans-membran pattern-tanım reseptörleri ailesine ait ve canlılarda patojenleri tanıyarak bağlanarak immünolojik yanıtı tetikleyen en az 13 toll-like reseptörü (TLR) bulunmaktadır. Bunlardan altısı (TLR1, 2, 4, 7, 8 ve 9) bakteri, protozoa ve mantarlar ile bunların sentetik ligandlarını tanıırken, beşi (TLR3, 4, 7, 8 ve 9) virus komponentlerini tanırlar (Akira ve Takeda, 2004; West ve ark., 2006). Henüz fonksiyonu tam olarak tanımlanamamış olan TLR10'un ise insanlarda fonksiyonel olduğu bildirilmiştir (Hasan ve ark., 2005). Bunlardan TLR3, 7, 8 ve 9 intasellüller olarak bulunurken, diğer alt TLR ailesinin diğer altı üyesi hücre zarında bulunmaktadır (Uciechowski ve ark., 2011). Sığırlarda farklı mikroorganizmaları tanıyarak ev sahibinin bağışıklık sistemini aktif hale getiren 10 tane TLR geni belirlenmiştir (Kataria ve ark., 2011). TLR'leri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların enfeksiyon etmenlerine karşı canlılarda doğal ve kazanılmış bağışıklığın aktivasyonun azalmasıdaki en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Franchimont ve ark., 2004; Hawn ve ark., 2007). Bunlardan TLR1, TLR4 ve özellikle TLR9 sığırlarda *Brucella* spp. tanıyarak doğal ve kazanılmış bağışıklığı etkilediği bildirilmiştir. (Prakash ve ark., 2014).

TLR2 ve TLR6 ile heteromer oluşturan TLR1 bakteri hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid, teichonik asit ve lipoproteinleri gibi çok çeşitli hücre duvarı komponentlerini tanıyarak nükleer faktör-kappa b'yi (NF-kB) aktive ederek immun yanıtın başlamasını tetikler (Akira ve ark., 2006). TLR1-TLR2 ve TLR1-TLR6 heterodimerleri Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarında bulunan PAMPs'ı tanıyarak makrofaj ve dendritik hücreleri aktive ederler (Omueti ve ark., 2007; Roura-Mir ve ark., 2005). TLR1 ve TLR4'ü kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar bakteri hücre duvarında bulunan lipoproteinler ve lipopolisakkaridler gibi komponentlerin makrofajları ve dendritik hücreler tarafından tanınmalarını azaltarak canlının hastalıklara duyarlılığını artırabilirler (Schwartz, 2002; Hawn ve ark., 2007). Sığırlarda TLR1'i kodlayan gende belirlenen polimorfizmlerin

bireyin patojenlere duyarlılığını etkileyerek, bireyin hastalık etkenlerine karşı gösterdiği immun yanıtı etkileyebildiği bildirilmiştir (Russell ve ark., 2012). TLR1 özellikle tuberküloz etkenininde dahil olduğu mikobakteria'lara karşı konakçı immun yanıtının oluşmasında çok önemli rolü vardır (Uciechowski ve ark., 2011).

TLR ailesinin en iyi tanımlanan üyesi olan TLR4, Gram negatif bakteri hücre duvarlarında bulunan lipopolisakkaridler (LPS) tarafından aktive edilir (Ibeagha-Awemu ve ark., 2008). TLR4, TLR ailesinin Gram negatif bakteriyel infeksiyonlarla ilişkili endotoksinleri tanıyan tek üyesidir (Takeda ve ark., 2003). Diğer taraftan TLR4, konakçı bağışıklık sistemi tarafından mikobakteriyel antijenleri tanıyarak sitokin üretimini düzenleyerek konakçı bağışıklık sisteminin uyarılmasında rol oynar (Wang ve ark., 2002; Quesniaux ve ark., 2004). Patojeni tanıma ve immun yanıtın başlatılmasındaki rolü nedeniyle özellikle süt sığırlarında hastalık direncini arttırmada TLR4'ü kodlayan genin uygun bir aday gen olduğu düşünülmektedir (Sharma ve ark., 2006). Sığırlarda, TLR4 geninde bulunan iki yanlış anlamlı mutasyon ile tuberküloz etkeni ile aynı genusta bulunan *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*'un sebep olduğu paratüberküloz hastalılığı ve yine TLR4 geninde belirlenen dört farklı polimorfizm ile hastalığın klinik seyri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Mucha ve ark., 2009).

Hemen tamamen makrofaj, dendritik hücreler, bağırsak ve solunum sistemi hücreleri ve keratinositlerdeki endozom ve fagozom çeperlerinde bulunan TLR9 bakteri, virus ve mantar DNA'larında bulunan metillenmemiş sitozin-fosfar-guanin (CpG) dinükleotidlerini tanır (Latz ve ark., 2004). *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium tuberculosis*'in yüksek bir immun sistem uyarıcısı CpG motifine sahip oldukları bildirilmiştir (Ronaghy ve ark., 2002). İnsanlarda yapılan çalışmalarda TLR9'u kodlayan gende belirlenen üç tek nükleotid polimorfizminin (SNP), TLR9'un ekspresyon düzeyini değiştirdiği bildirilmiştir (Tao ve ark., 2007; Lange ve ark., 2011). Endozom ve fagozom zarında bulunan TLR9 patojenin hücre için girmesinden sonra mikobakteriyel DNA tarafından tetiklenir (Latz ve ark., 2004). Bu nedenden dolayı TLR9'un *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı iyi bir aday gen olduğu düşünülebilir (Bafica ve ark., 2005).

SLC11A1 proteini memelilerde, bitkilerde ve bakterilerde korunmuş bir gen tarafından kodlanır (Cellier ve ark., 1995). SLC11A1 proteini memelilerde fagozomların membranlarında özellikle de makrofajların hücre zarlarında bulunmaktadır (Gruenheid ve ark., 1997). Bu proteinler fagozomların lümenlerinden sitosole doğru iki değerlikli demir (Fe^{+2}) ve manganez (Mn^{+2}) kasyonların taşınmasında görev yaparak hücre içi patojenlerinin

demir alımını önlerler (Wyllie ve ark., 2002; Forbes ve Gros, 2003). Bunun yanında SLC11A1 proteini kodlayan genin pleiotropik etkilerle adaptif immün yanıtın oluşmasında da katkısı olduğu bildirilmiştir (Paixão ve ark., 2006). Bu etkilerinden dolayı SLC11A1 makrofajların bakterileri yok etmelerini sağlayan doğal bağışıklıkta önemli rol oynar, SLC11A1 proteini doğal bağışıklık yanında kazanılmış bağışıklığın oluşmasında da görev alır (Paixão ve ark., 2006). Bu amaçla yapılan ilk çalışmalarda, farelerde SLC11A1 proteini ile *Mycobacterium* türlerine karşı doğal bağışıklıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Vidal ve ark., 1995). Daha sonra SLC11A1 genin insanlarda, bir başka hücre içi patojeni olan *Mycobacterium tuberculosis* ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bellamy ve ark., 1998).

Sığırlarda SLC11A1 proteinini kodlayan genin sekansı ilk olarak Feng ve ark. (1996) tarafından belirlenmiştir. Daha sonra Horin ve ark. (1999) Red Pied sığır ırkında SLC11A1 geninin 3' UTR bölgesinde bir polimorfizmin bulunduğunu ve bu polimorfizmin yine bir hücre içi patojeni olan *Brucella abortus*'a duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda da sığır (Barthel ve ark., 2001) ve mandada (Borriello ve ark., 2006; Capparelli ve ark., 2007) SLC11A1 geninde bulunan başka polimorfizmler ile *Brucella abortus*'a karşı doğal bağışıklık arasında ilişki olduğunu bildirilmiştir. Benzer şekilde sığır (Reddacliff vd., 2005) ve koyunlarda (Juste ve ark., 2005) *Mycobacterium tuberculosis*'in sebep olduğu paratüberküloz hastalığına yatkınlık ve hastalığın klinik belirtileri ile SLC11A1 geni ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle SLC11A1 proteinini kodlayan genin, özellikle hücre içi patojenlerine karşı doğal direncin gelişmesinde potansiyel bir aday gen olduğu düşünülmektedir (Kumar ve ark., 2011). SLC11A1 proteini, enfeksiyonun başlangıç aşamasında bakteri büyümesini önleyerek intracellüler patojenlere karşı doğal bağışıklıkta çok önemli rol oynar bu nedenle SLC11A1'i kodlayan genin brusella ve tüberküloz gibi enfeksiyonlara karşı dirençli bireylerin seçilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Pinedo ve ark., 2009).

İnterferonlar çok genli bir ailesi olan indüklenebilir sitokinler tarafından oluşturulurlar. Bu grubun bir üyesi olan interferon gama (IFN-g), mycobacteria da dahil olmak üzere intraselüler bakterilere karşı konakçıların doğal bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynamaktadır (Shtrichman ve Samuel, 2001). Koruyucu tip 1 benzeri T hücre tepkisinin bir parçası olarak tüberküloz, paratüberküloz ve brusella etkeni gibi hücre içi patojen mikro organizmalar konakçı hücrelerinin içine girişinden sonra enfeksiyon ve hastalık belirtilerinin kontrolünde önemli bir faktör olan IFN-g salınır (Coussens ve ark., 2002). Bu nedenle yapılan bu projede

IFN-g'yı kodlayan genin tüberküloz ve brucella gibi hücre içi patojen mikroorganizmalarına karşı dirençli bireylerin seçiminde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Sığırlarda bir hücre içi patojeni olan brucella etkeninin sebep olduğu enfeksiyonun ve çok önemli bir zoonoz olan tüberkülozun önlenmesinde bu dört genin genotip ve allelik yapısı ile brucella ve tüberküloz enfeksiyonlarının gelişip, gelişememe durumunun ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle yapılan bu çalışmada, ülkemizde en yaygın yetiştiriciliği yapılan kültür ırkı sığır olan Holstein ile yerli sığır ırklarımız ve bunların melezlerinin bu beş gende bulunan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) yönünden genotiplendirilmeleri ve bu SNP'ler ile brucella ve tüberküloz enfeksiyonları arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada 100 baş Holstein ırkı sığır ile 400 baş yerli ve yerli melezi sığıra ait kan örnekleri mezbahalardan toplanmıştır. Çalışmada kullanılan 47 baş yerli ve melezi ile 26 baş Holstein ırkı tüberkülozlu sığırlara ait kan örnekleri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 21523 sayılı izni ile toplanmıştır. Genetik ve serolojik analizler için alınan kan örnekleri *Venae jugularis*'den K3EDTA'lı, antikoagülsiz ve lityum heparinli vakumlu steril tüplere alınmıştır. Alınan kanlar yapılacak testlere göre uygun koşullarda laboratuvarlara getirilmiştir. Tüberküloz gamma interferon testi için lityum heparinli tüplere alınan kanlar ortam ısısında ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve 30 saat süre içinde laboratuvara ulaşımları sağlanmıştır. Laboratuvara getirilen kanlara test prosedürüne göre aynı gün ön işlemleri yapılmıştır. Yapılacak serolojik analizler için alınan kan numuneleri 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edilecek ve çıkartılan serumlar analizler yapılncaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Genetik analizler için kullanılacak DNA örnekleri K3EDTA'lı tüplerde bulunan tam kandan izole edilerek yapılacak PCR-RFLP analizlerinde kullanılıncaya kadar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.2. Serolojik Analizler

Brucella ve tüberküloz enfeksiyonlarına karşı serumlarda antikorların varlığının tespiti amacıyla Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testleri uygulanmıştır. Testlerin yapılışı kiti üreten firmanın bildirdiği yöntemine göre yapılmıştır. Ayrıca Tüberküloz enfeksiyonunda hücrel immun yanıtın ortaya konulabilmesi için gamma interferon (IFN- γ) ELISA testi kullanılmıştır. Test firmanın bildirdiği prosedüre göre yapılmıştır.

2.2.1. *Brusella (Brucella-Ab C-ELISA) ELISA'nın Yapılışı*

Bu amaçla SVANOVIR® competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) Test Kiti (Svanova, Sweden) kullanılmıştır. Kitler çalışmadan en az 1 saat önce dışarı çıkarılarak oda ısısında bekletilmiştir. Test edilecek serumlar ile negatif, pozitif ve zayıf pozitif kontrol serumları Dilution Buffer ile 1/10 oranında sulandırılmıştır. Mikropleyitin A1-A2 kuyucuğuna 50 µl dilüe edilmiş negatif kontrol serumu, A3-A4 kuyucuğuna 50 µl dilüe edilmiş pozitif kontrol serumu ve A5-A6'e kuyucuğuna ise 50 µl dilüe edilmiş zayıf pozitif kontrol serumu ilave edilmiştir. Kontrol numunelerinden sonra her göze 50 µl dilüe edilmiş sığır serumlarından ilave edilmiştir. Mikropleyitin tüm gözlerine Dilution Buffer ile sulandırılarak, mAb solüsyonundan 50'şer µl ilave edilerek oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mikropleyitin içindeki sıvı bir küvete boşaltılacak ve kuyucuklar 1/20 oranında distile su ile sulandırılmış ve PBS-Tween Buffer kullanılarak dört kere yıkanmıştır. Her kuyucuğa hazır konjugat solüsyonundan 100'er µl ilave edilip mikromikser'de karışımı sağlanacak ve mikropleyitler 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yıkama aşaması yukarıda belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. Mikropleyitin her kuyucuğuna substrat solüsyonundan 100 µl ilave edilip 10 dk karanlık bir ortamda inkübasyona tabii tutulmuştur. Süre sonunda mikropleyitin her kuyucuğuna 50'er µl stop solüsyonu ilave edilmiştir. Test sonuçları 450 nm'de ELISA reader (BioTek ELx808, United States) okunmuştur. Elde edilen değerlerin hesaplaması yapılmıştır.

2.2.2. *Tüberküloz Gamma İnterferon (IFN-γ) ELISA'nın Yapılışı*

Bu amaçla *Mycobacterium bovis* Gamma İnterferon Test Kiti (Anigen, Korea) kullanılmıştır. Heparinli kan alma tüpleri içerisinde alınan numunelere laboratuvarında ön işlem uygulanmıştır. Bu amaçla lityum heparinli tüplerde en az 5 ml olarak alınan kanların homojenizasyonu için alt üst edilmiştir. Doku pleytinin üçer gözüne her bir kan numunesinden 1.5 ml kan ilave edilmiştir. Birinci göze 100 µl steril Phosphate Buffer Solüsyonu (PBS), ikinci göze Tuberculin PPD Avian ve üçüncü göze de Tuberculin PPD Bovian damlatılarak pleyt içeriğinin mikromikser'de karışımı sağlanacak ve pleytler 37 °C'de 16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda pleytler santrifüj edilerek üst kısımda yer alan plazma testte kullanılmak üzere + 4 °C'de 7 gün saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak ELISA kiti çalışmadan en az 1 saat önce dışarı çıkarılarak oda derecesinde bekletilmiştir. Mikropleyitin tüm gözlerine 100 µl Sample Diluent ilave edilmiştir. A1-B1-C1 kuyucuğuna negatif kontrol, A2-B2-C2 kuyucuğuna pozitif kontrol ve her bir numunenin plazmalarından (PBS, Tuberculin PPD Avian ve Tuberculin PPD Bovian) üçer göze 50'şer µl damlatılmıştır.

Pleytlerin üzeri parafilm ile kaplanarak içeriğinin mikromikser’de karışımı sağlanacak ve 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakılacaktır. Süre sonunda mikropleyitin içindeki sıvı bir küvete boşaltılacak ve kuyucuklar 1/20 oranında distile su ile sulandırılmış yıkama solüsyonu kullanılarak beş kere yıkanmıştır. Her kuyucuğa hazırlanan amplifikasyon konjugat solüsyonundan 100’er µl ilave edilip 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yıkama aşaması yukarıda belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. Mikropleyitin her çukurcuğuna substrat solusyonundan 100 µl ilave edilip 30 dk karanlık bir ortamda oda ısısında inkübasyona tabii tutulmuştur. Süre sonunda mikropleyitin her kuyucuğuna 100’er µl stop solüsyonu ilave edilmiştir. Test sonuçları 450 nm’de ELISA reader (BioTek ELx808, United States) okunmuştur. Elde edilen değerlerin hesaplaması yapılmıştır.

2.2.3. Tüberküloz Antikor (MBAb) ELISA’nın Yapılışı

Bu amaçla *Mycobacterium bovis* Antikor Test Kiti (Idexx, France) kullanılacaktır. Kitler çalışmadan en az 1 saat önce dışarı çıkarılarak oda derecesinde bekletilmiştir. Test edilecek serumlar ile negatif ve pozitif kontroller Sample Diluent ile 1/50 oranında sulandırılmıştır. Mikropleyitin A1-A2 kuyucuğuna 100’er µl dilüe edilmiş negatif kontrol serum konulmuştur. A3-A4’e kuyucuğuna ise 100’er µl dilüe edilmiş pozitif kontrol serum ilave edilmiştir. Kontrol numunelerinden sonra her göze dilüe edilmiş sığır serumlarından 100’er µl ilave edilerek oda ısısında 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mikropleyitin içindeki sıvı bir küvete boşaltılacak ve kuyucuklar 1/10 oranında distile su ile sulandırılmış yıkama solüsyonu kullanılarak beş kere yıkanmıştır. Her kuyucuğa hazır konjugat solüsyonundan 100’er µl ilave edilip mikromikser’de karışımı sağlanarak, mikropleyitler 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda yıkama aşaması yukarıda belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. Mikropleyitin her çukurcuğuna substrat solusyonundan 100 µl ilave edilip 15 dk karanlık bir ortamda inkübasyona tabii tutulmuştur. Süre sonunda mikropleyitin her kuyucuğuna 100’er µl stop solüsyonu ilave edilmiştir. Test sonuçları 450 nm’de ELISA reader (BioTek ELx808, United States) okunmuştur. Elde edilen değerlerin hesaplaması yapılmıştır.

2.3. Örneklerin Dört Gen Yönünden Genotiplendirilmesi

2.3.1. Toll Like Reseptör 1 (TLR 1) Gen Polimorfizmleri

2.3.1.1. TLR1 +1380 G/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

Bu amaçla yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) primer disizi F: 5’-TTTAGCAGCCTTTCCATACT-3’; R: 5’-TCTACCACGTCCTGGATACT-3’ olan bir primer seti kullanılmıştır. TLR1 +1380 G/A tek nokta mutasyonunun belirlenmesi amacıyla

yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C’de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C’de 30 sn, 55 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C’de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirildi. Elde edilen 179 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. PCR’ ın başarılı olduğu PCR ürünleri *Bs*II endonükleaz enzimi ile kesildi. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3’lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlendi. Kesim sonunda AA genotipindeki bireylerde 179 bp uzunluğunda tek bant, GG genotipindeki bireylerde 93 ve 86 bp’lik iki bant, AG genotipindeki bireylerde ise 179, 93 ve 86 bp’lik üç bant elde edilmesi beklendi.

2.3.1.2. TLR1 +1446 C/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR1 +1446 C/A tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5’- TTTAGCAGCCTTTCCATACT-3’; R: 5’- CAGATCCAGGTAGATACAGAG- 3’ olacak şekilde bir primer seti kullanılacaktır. TLR1 +1446 C/A tek nokta mutasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C’de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C’de 30 sn, 54 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C’de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 354 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR’ ın başarılı olduğu PCR ürünleri *Bst*XI endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3’lik agaroz jel elektroforezi ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda AA genotipindeki bireylerde 354 bp uzunluğunda tek bant, CC genotipindeki bireylerde 187 ve 167 bp’lik iki bant, AC genotipindeki bireylerde ise 354, 187 ve 167 bp’lik üç bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.1.3. TLR1 G1596A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR1- G1596A tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5’-TTTAGCAGCCTTTCCATACT-3’; R: 5’- CAGATCCAGGTAGATACAGAG-3’ olacak şekilde bir primer seti kullanılacaktır. TLR1-

G1596A tek nokta mutasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C’de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C’de 30 sn, 64 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde 35 döngü yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C’de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 354 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR’ ın başarılı olduğu PCR ürünleri *Bcl*I endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3’lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda HH genotipindeki bireylerde 333 ve 21 bp uzunluğunda iki bant, GG genotipindeki bireylerde 261, 72 ve 21 bp’lik üç bant, GH genotipindeki bireylerde ise 333, 261, 72 ve 21 bp’lik dört bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.2. Toll like reseptör 4 (TLR 4) Gen Polimorfizmleri

2.3.2.1. TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5’- CGTAACCCAGCACTGCTTTG-3’; R: 5’- GCCTGTTAATGCCCTGTAACC-3’ olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. TLR4 +10 C/T tek nokta mutasyonunun belirlenmesi için yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C’de 30 sn, 59,2 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde 35 döngü yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C’de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 405 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR’ ın başarılı olduğu PCR ürünleri kullanılarak *Bst*UI endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3’lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda TT genotipindeki bireylerde 405 bp uzunluğunda tek bant, CC genotipindeki bireylerde 246 ve 159 bp uzunluğunda iki bant, TC genotipindeki bireylerde ise 405, 246 ve 159 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.2.2. TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5'- CACCTCTCCACCTTGATACTG -3'; R: 5'- CTTCGCAGAGTCAATCCATTG -3' olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. TLR4 +399 C/T tek nokta mutasyonunun belirlenmesi için yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C'de 30 sn, 57,2 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C'de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 398 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR' ın başarılı olduğu PCR ürünleri *Hae*III endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda TT genotipindeki bireylerde 398 bp uzunluğunda tek bant, CC genotipindeki bireylerde 307 ve 91 bp uzunluğunda iki bant, TC genotipindeki bireylerde ise 398, 307 ve 91 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.3. Toll like reseptör 9 (TLR 9) Gen Polimorfizmleri

2.3.2.1. TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5'- GTCTGCAGCTGAACCTTCATC -3'; R: 5'- ACGAACTGGGAGCCATTAAC -3' olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. TLR9 +1310 G/A'nın tek nokta mutasyonunun belirlenmesi için yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C'de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C'de 40 sn, 56,8 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C'de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 392 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR' ın başarılı olduğu PCR ürünleri *Bse*RI endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda CC genotipindeki bireylerde 392 bp uzunluğunda tek bant, TT genotipindeki bireylerde 251 ve

141 bp uzunluğunda iki bant, CT genotipindeki bireylerde ise 392, 251 ve 141 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.2.2. TLR9 A2700G tek nokta polimorfizminin belirlenmesi;

TLR9-A2700G tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5'- ATCTTCAACGACCTGACCCA -3'; R: 5'- AATCGCCAGACTTCCACCCT -3' olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. TLR9-A2700G'nın tek nokta mutasyonunun belirlenmesi için yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C'de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C'de 40 sn, 67,5 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Son döngüyü takiben tüpler 72 °C'de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Yapılan PCR işlemi sonunda 362 bp uzunluğunda PCR ürünlerinin elde edilmesi ve 362 bp'lık PCR ürünlerinin *BfaI* endonükleaz enzimi ile kesilmesi sonucunda GG genotipindeki bireylerde 362 bp uzunluğunda tek bant, AA genotipindeki bireylerde 280 ve 82 bp uzunluğunda iki bant, AG genotipindeki bireylerde ise 362, 280 ve 82 bp uzunluğunda üç bandın elde edilmesi beklenmiştir (Sun ve ark., 2012).

2.3.4. Solute Carrier Family 11, Member 1 (SLC11A1) Gen Polimorfizminin Belirlenmesi

SLC11A1 +1066 C/G tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak, F: 5'- ATCTCCTTCTACTGCCCCG -3'; R: 5'- CACAACTGTCCCGCGTAG -3' olacak şekilde bir primer seti kullanılacaktır. SLC11A1 +1066 C/G tek nokta mutasyonunun belirlenmesi için yapılacak PCR karışımı 20 µL reaksiyon karışımı olacak şekilde hazırlandı. Karışım 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM primer, 1×PCR buffer, 1U Taq polimeraz 50-10 ng genomik DNA olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım, ısı düzenleme aletinde 94 °C'de 5 dk tutularak tek iplikçik haline getirildikten sonra bir döngüsü 94 °C'de 30 sn, 54 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü olarak yapılmıştır. Son döngüyü takiben 72 °C'de 7 dk tutularak PCR işlemi bitirilmiştir. Elde edilen 374 bp uzunluğunda PCR ürünleri %2'lik agaraz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. PCR'ın başarılı olduğu PCR ürünleri *PstI* endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda CC genotipindeki bireylerde 374 bp uzunluğunda tek bant, GG genotipindeki bireylerde 293 ve 81 bp

uzunluğunda iki bant, CG genotipindeki bireylerde ise 374, 293 ve 81 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir.

2.3.5. Sığır IFNG Geninin 1. Eksonunda Bulunan 2781G/T Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi

Bu amaçla Taq-Man genotipleme probu dizayn edilmiştir. Bu amaçla sığır SNP veritabanında bulunan rs110725749 referans numaralı SNP bilgisi, prob dizayn eden firmaya gönderilmiştir. Firmanın ürettiği bu SNP ye özgü işaretlenmiş problemler ile incelenen bireylerin genotipleri Roche Light Cycler cihazı ile belirlenmesine çalışılmıştır.

2.3.6. Sığır Myd88 Myeloid Differentiation Primary Response (88) Geninin 1. Eksonunda Bulunan (A625C) Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi

Bu amaçla Capparelli ve ark. (2013) tarafından önerilen Taq-Man prob bilgisi ile bu SNP ye özgü işaretlenmiş VIC 5-TAGCAAGGGAGACATT-3 ve 6-carboxyfluorescein 5-TAGCAAGGGCGACATT-3 problemlerin dizayn edilmesi planlanmıştır. Dizayn edilen bu problemler kullanılarak Roche Light Cycler cihazın ile bireylerin bu SNP yönünden genotiplerinin belirlenmesi planlanmıştır.

2.4. İstatistik Analiz

Sığırlarda tüberküloz görülme oranı üzerinde etkili olduğu düşünülen SNP'ler, tek değişkenli (Univariate) Lojistik Regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. ELISA testi sonuçlarına göre tüberküloz (+) olan örnekler "1", tüberküloz (-) olan örnekler ise "0" olarak kodlanmıştır. Lojistik regresyon modelinde; tüberküloz durumu bağımlı değişken olarak, genotipler kategorik bağımsız değişken olarak tanımlanmıştır. Modellerin yorumlanmasında; Odds oranları (OR, Odds Ratio) oranları kullanılmıştır. İstatistik analizler NCSS 9.0 programında yapılmıştır. (Odd Ratio: Bağımlı değişkenin bağımsız değişken etkisi ile kaç kat fazla gözleme olasılığına sahip olduğunu belirtir.)

Çalışmada Tüberküloz ile ilişkili olabileceği düşünülen genlere ait tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapılarak hastalık ile ilişkileri incelenmiştir. Değişkenlere ait modelleri içeren çizelgede.

$\hat{\beta}$: Kestirilen eğim katsayısı ; $SE(\hat{\beta})$: Kestirilen eğim katsayısının standart hatası

Wald : Model için eğitim katsayılarının sıfıra eşit olup olmadığını test eden Wald istatistiği; P: Wald istatistiğine ait P değeri; OR: Kestirilen odds oranı ve buna ait % 95 güven aralığı verilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Yapılan çalışmada 100 baş Holstein ve 400 baş yerli ve yerli melezi sığırdan başarı ile kan örnekleri toplanmıştır. Ancak Holstein ırkı sığırlardan toplanan kanlardan bir tanesinde sorunla karşılaşılınmamışken, yerli ve yerli melezlerinden alınan kan örneklerinden 34 tanesi kanlarda hemoliz olması veya kesim esnasında su sıçraması nedeniyle tüberküloz ve brusella testlerinde kullanılamamıştır. Ancak proje başında, çalışmada incelenecek hayvanların en az 250'sinin yerli ve melezi olması planlanmıştır. Çalışmada 366 yerli ve yerli melezi ile 99 Holstein ırkı sığırdan tüberküloz ve brusella antikor seviyelerine bakıldığı için bu hedefe ulaşıldığı düşünülmüştür. Ayrıca çalışmada toplamda 400 baş yerli ve melezi ile 100 baş Holstein ırkı sığır incelenen SNP'ler yönünden genotiplenmiştir.

3.2. Serolojik Analizler

3.2.1. Brusella (Brucella-Ab C-ELISA) ELISA Sonuçları

Çalışmada toplam 366 yerli meleziye ait kan örneği incelenmiştir. Yapılan Brucella-Ab C-ELISA sonucuna göre incelenen örneklerden sadece 16 baş yerli ve melezi sığırın brusella pozitif olduğu belirlenmiştir. İncelenen holsteinlerde brusella antikoruna rastlanılamamıştır.

3.2.2. Tüberküloz Gamma İnterferon (IFN- γ) ELISA'nın Sonuçları

Araştırmada 368 baş yerli ve yerli melezi sığırdan alınan kan örneklerinden ikisi hemoliz tespit edildiği için analiz dışı bırakılmış ve çalışmada toplam 366 kan örneği incelenmiştir. Tüberkülin testi sonucu, pozitiflik tespit edilen 47 baş yerli ve melezi ve 99 baş saf Holstein ırkı sığırın da dahil olduğu toplam 465 sığır gamma interferon (IFN- γ) ELISA ile analiz edilmiştir.

3.2.3. Tüberküloz Antikor (MBAb) ELISA Sonuçları

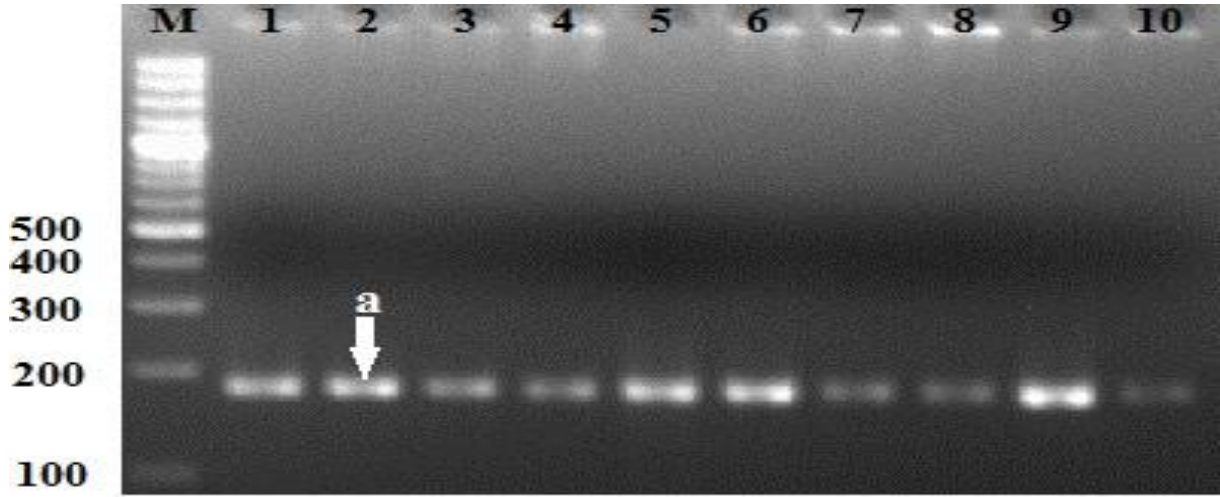
Analiz sonucunda 47 baş yerli ve melezi ile 26 baş saf Holstein olmak üzere toplam 73 sığır MBAb ve IFN- γ testleri yönünden pozitif olduğu görülmüştür.

3.3. Örneklerin Altı Gen Yönünden Genotiplendirilmesi

3.3.1. Toll Like Reseptör 1 (TLR 1) Gen Polimorfizm Sonuçları

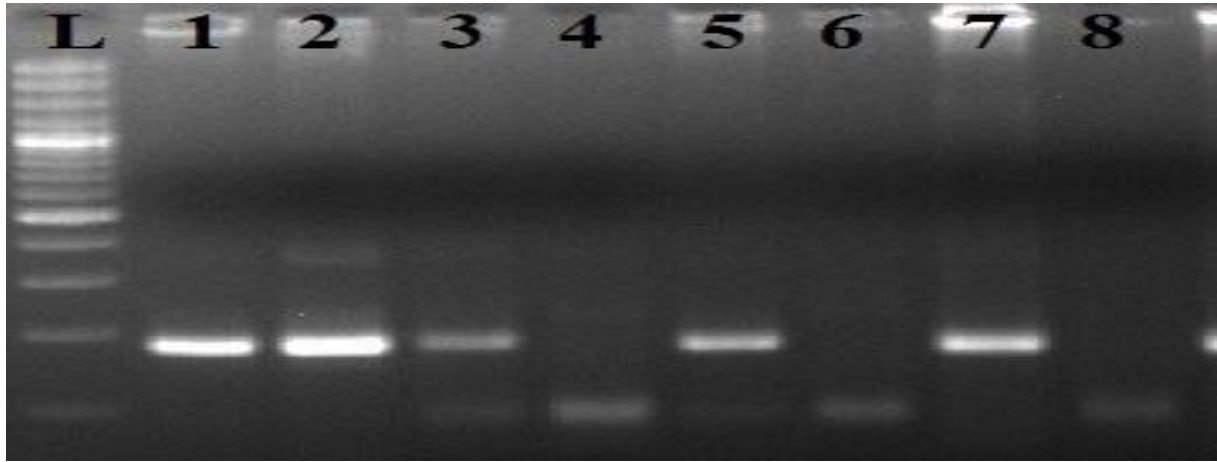
3.3.1.1. TLR1 +1380 G/A tek nokta polimorfizmi

TLR1 +1380 G/A tek nükleotidi için yapılan PCR işlemi sonunda 179 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. TLR1 +1380 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 179 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA merdiveni.

Elde edilen PCR ürünleri *Bs1I* enzimi ile kesilmiş, kesim sonunda A ve G allelleri ile AA (179 bp), AG (179, 93 ve 86 bp) ve GG (93 ve 86 bp) üç genotip elde edilmiştir. Ancak GG genotipli bireylerde 93 ve 86 bp'lik bantların, bant büyüklüklerinin bir birlerine çok yakın olmaları nedeniyle, çekilen elektroforez fotoğraflarında bir bu iki bant birlerinden ayıramamışlardır. Buna rağmen elektroforez hattında 179 bp'lik bandın bulunup bulunmamasına göre bireylerin genotipleri kolaylıkla belirlenebilmiştir (Şekil 2).

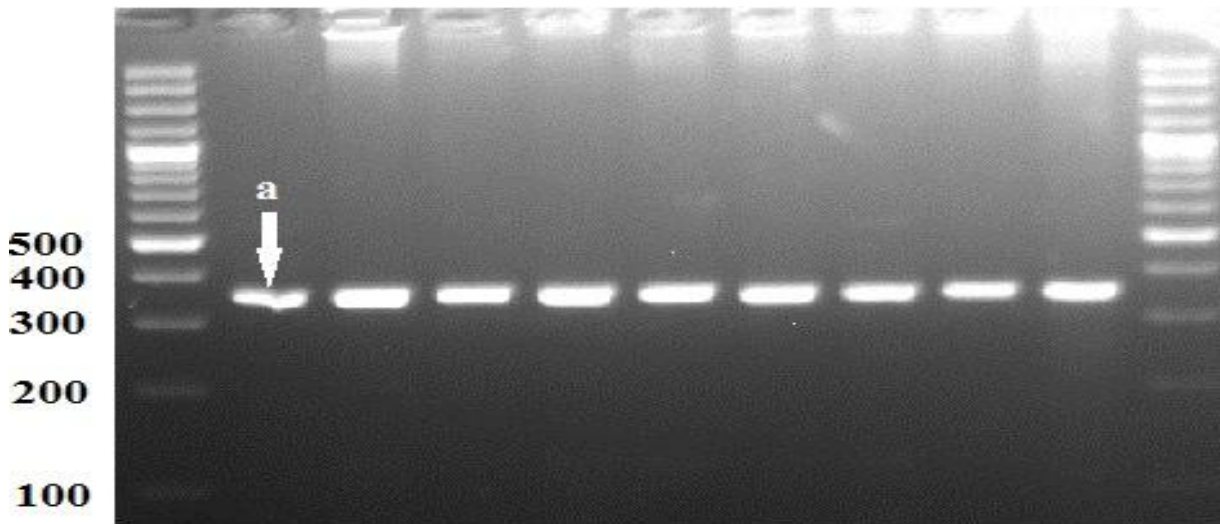


Şekil 2. TLR1 +1380 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *BsII* enzim kesim görüntüsü. L: DNA mediveni (100 bp); 1, 2 ve 7: AA genotipli bireyler; 3 ve 5: AG genotipli bireyler; 4, 6 ve 8: GG genotipli bireyler.

TLR1 +1380 G/A yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde AG genotipinin (%59.2; %54.75 sırasıyla) genotip olduğu, AA genotipinin ise her iki ırkta da en az görülen genotip olduğu görülmüştür (%1; %0.5). G allel frekansının her iki ırkta da en yüksek olduğu (0.69; 0.72 sırasıyla) ve her iki ırkın bu SNP yönünden yapılan Ki-kare analizi sonucu Hardy-Weinberg dengesinden ayrıldığı görülmüştür (Tablo 1).

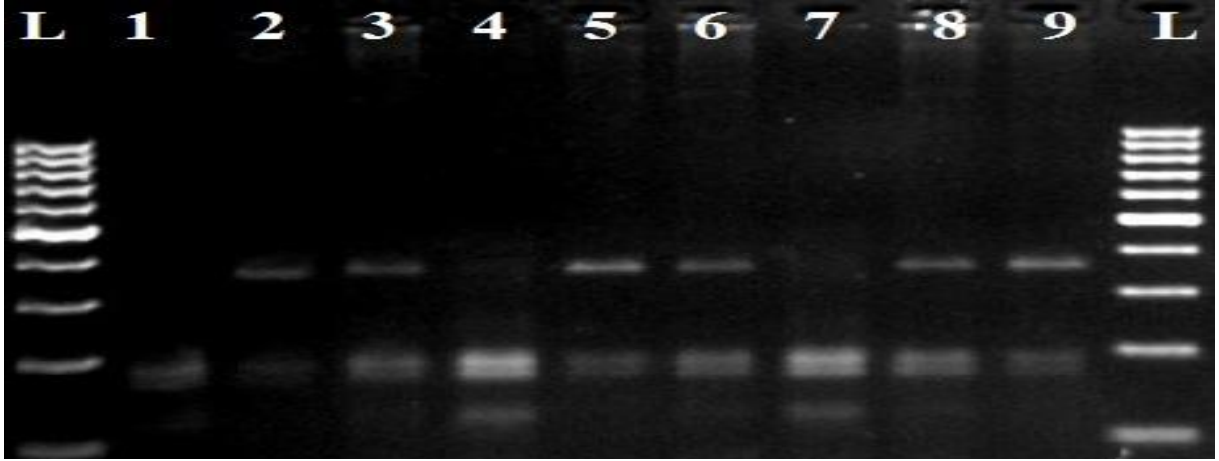
3.3.1.2. TLR1 +1446 C/A tek nokta polimorfizmi

Yapılan PCR işlemi sonunda 354 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. TLR1 +1446 C/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 354 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü.

Elde edilen PCR ürünleri *BstXI* enzimi ile kesilmiş, kesim sonunda A ve C allelleri ile AA (354 bp), AC (354, 187 ve 167 bp) ve CC (187 ve 167 bp) üç genotip elde edilmiştir (Şekil 4).

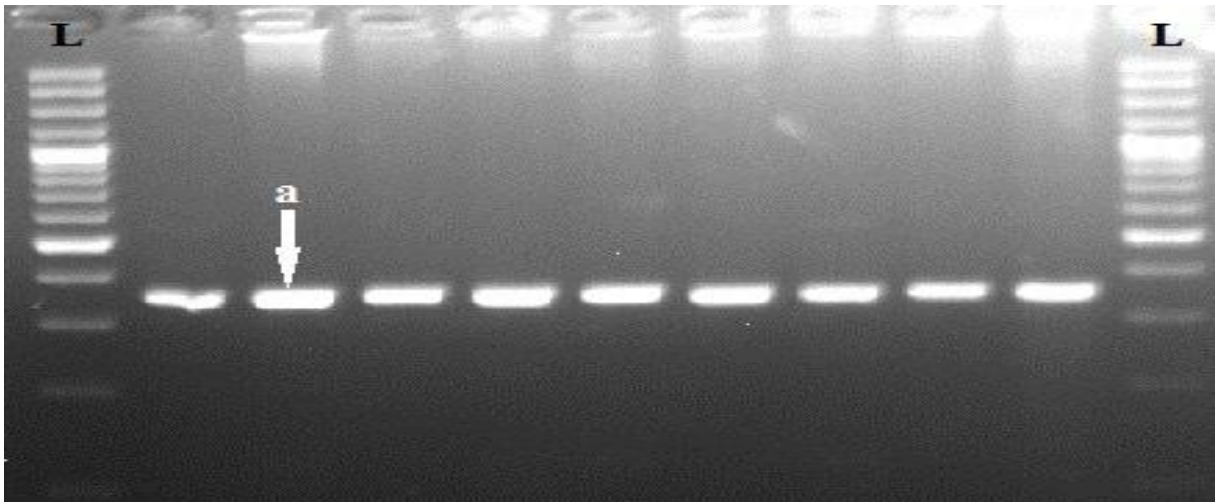


Şekil 4. TLR1 +1446 C/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *Bst*XI enzim kesim görüntüsü. L: DNA merdiveni (100 bp); 1, 4 ve 7: CC genotipli bireyler; 2, 3, 5, 6, 8 ve 9: AC genotipli bireyler.

TLR1 +1446 C/A tek nükleotid polimorfizmi yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde AC genotipinin (%91; %88.5 sırasıyla) genotip olduğu, AA genotipinin ise her iki ırkta da en az görülen genotip olduğu görülmüştür (%0; %3). C allel frekansının her iki ırkta da en yüksek olduğu (0.55; 0.53 sırasıyla) ve her iki ırkın bu SNP yönünden yapılan Ki-kare analizi sonucu Hardy-Weinberg dengesinden ayrıldığı görülmüştür (Tablo 1).

3.3.1.3. TLR1 G1596A tek nokta polimorfizmi

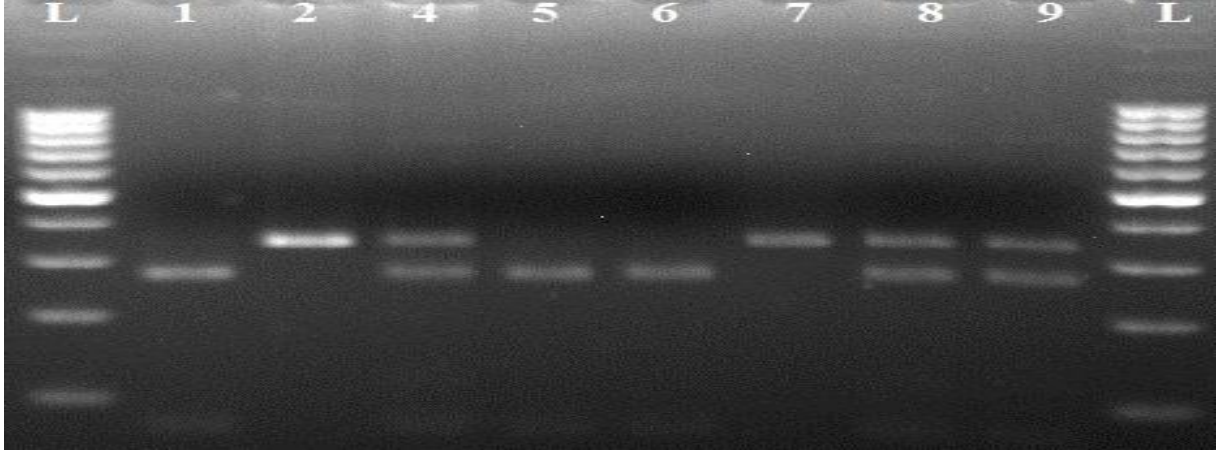
Yapılan PCR işlemi sonunda 354 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. TLR1 G1596A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 354 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü; L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

Elde edilen 354 bp uzunluğunda PCR ürünlerinin *Bcl*II endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonunda HH genotipindeki bireylerde 333 ve 21 bp uzunluğunda iki bant, GG

genotipindeki bireylerde 261, 72 ve 21 bp'lik üç bant, GH genotipindeki bireylerde ise 333, 261, 72 ve 21 bp'lik dört bant elde edilmesi beklenmiştir (Şekil 6).



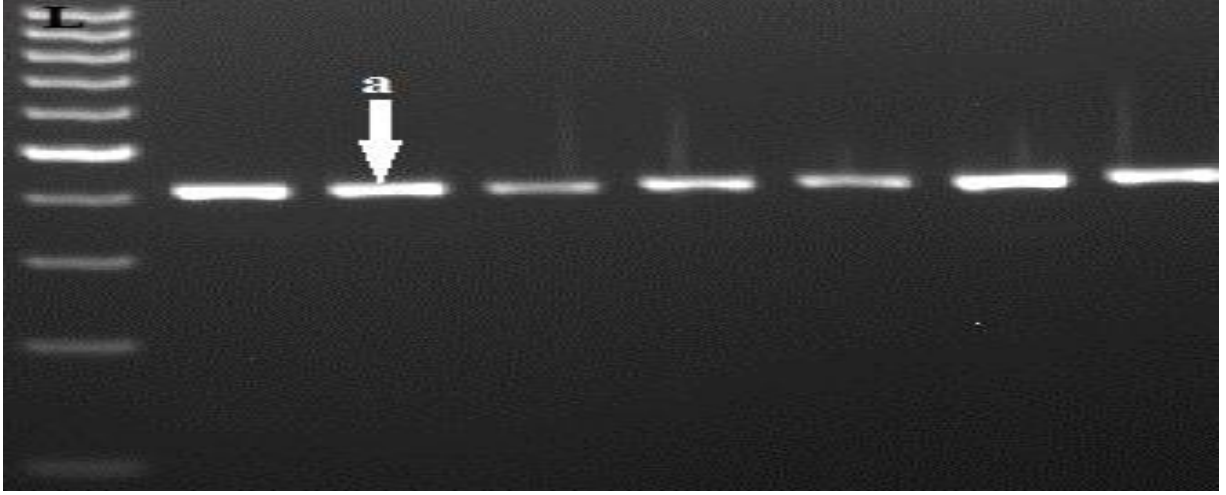
Şekil 6. TLR1 G1596A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *BclI* enzim kesim görüntüsü. L: DNA mediveni (100 bp); 1, 5 ve 6: GG genotipli bireyler; 2 ve 7: HH genotipli bireyler; 4, 8 ve 9 GH genotipli bireyler.

TLR1 G1596A tek nükleotid polimorfizmi yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde GH genotipinin (%52.52; %41.65 sırasıyla) genotip olduğu, GG genotipinin ise her iki ırkta da en az görülen genotip olduğu görülmüştür (%23.23; %24.42). H allel frekansının her iki ırkta da en yüksek olduğu (0.51; 0.55 sırasıyla) ve her iki ırkın bu SNP yönünden yapılan Ki-kare analizi sonucu Holstein ırkında Hardy-Weinberg dengesini devam ettiği görülmüşken, yerli melezlerinde Hardy-Weinberg dengesini bozulduğu görülmüştür (Tablo 1).

3.3.2. Toll like reseptör 4 (TLR 4) Gen Polimorfizm Sonuçları

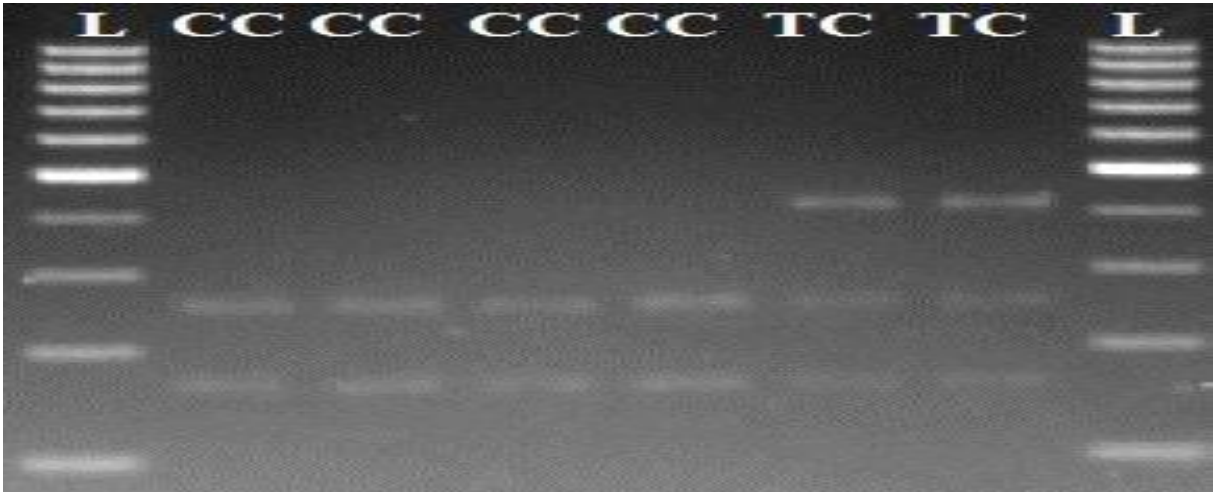
3.3.2.1. TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizmi

TLR4 +10 C/T tek nokta polimorfizmini belirlemek için PCR işlemi sonunda 405 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. TLR4 +10 tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 405 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü; L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

Elde edilen PCR ürünleri *Bst*UI endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. CC genotipindeki bireylerde 246 ve 159 bp uzunluğunda iki bant, TC genotipindeki bireylerde ise 405, 246 ve 159 bp uzunluğunda üç bant elde edilmiştir. Kesim sonunda her iki ırkta da TT genotipindeki bireylere rastlanılmamıştır (Şekil 8).

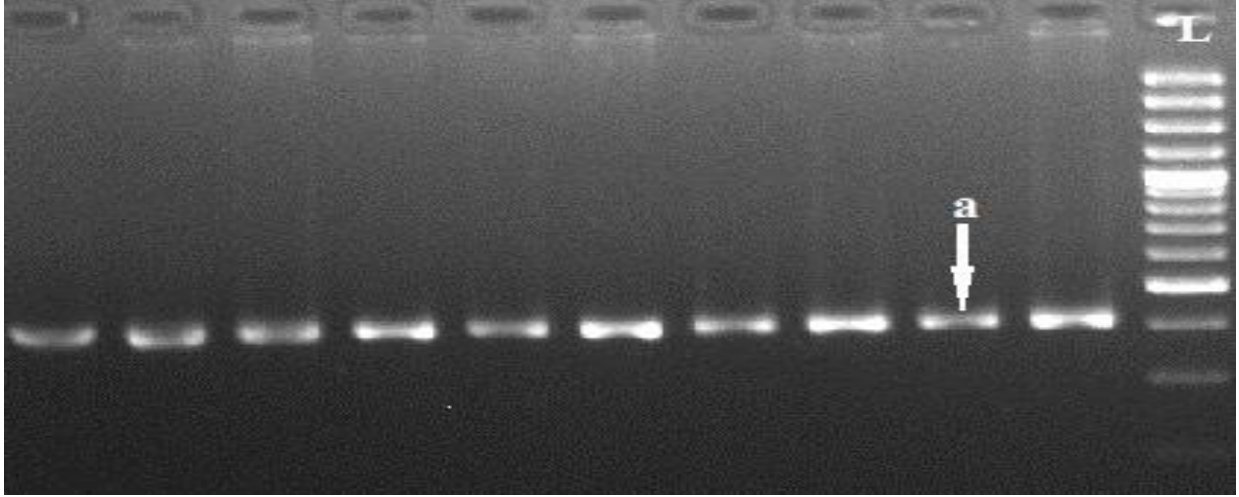


Şekil 8. TLR4 +10 tek nükleotid polimorfizmi belirlenmesi için yapılan *Bst*UI enzim kesimi sonunda elde edilen bant profillerinin görüntüsü; L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

TLR4 +10 tek nükleotid polimorfizmi yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde CC genotipinin (%97.97; %98.5 sırasıyla) genotip olduğu, TT genotipi her iki ırkta da belirlenememiştir. Ki-kare analizi sonucu her iki ırkın bu SNP yönünden Hardy-Weinberg dengesinde oldukları görülmüştür (Tablo 1).

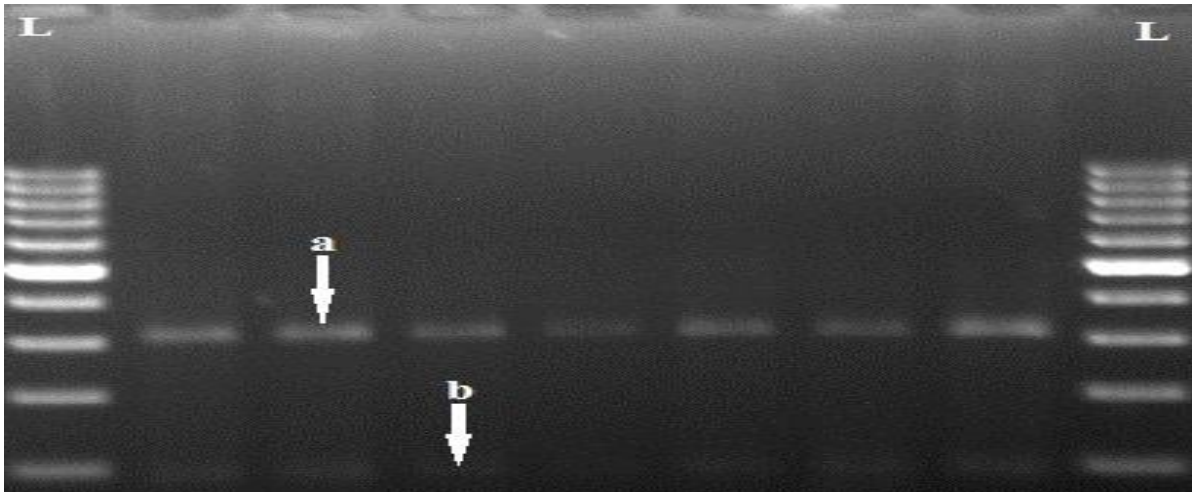
3.3.2.2. TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizmi

TLR4 +399 C/T tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 398 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. TLR4 +399 tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 398 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü; L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

PCR' ın başarılı olduğu PCR ürünleri kullanılarak *HaeIII* endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda TT genotipindeki bireylerde 398 bp uzunluğunda tek bant, CC genotipindeki bireylerde 307 ve 91 bp uzunluğunda iki bant, TC genotipindeki bireylerde ise 398, 307 ve 91 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir (Şekil 10).



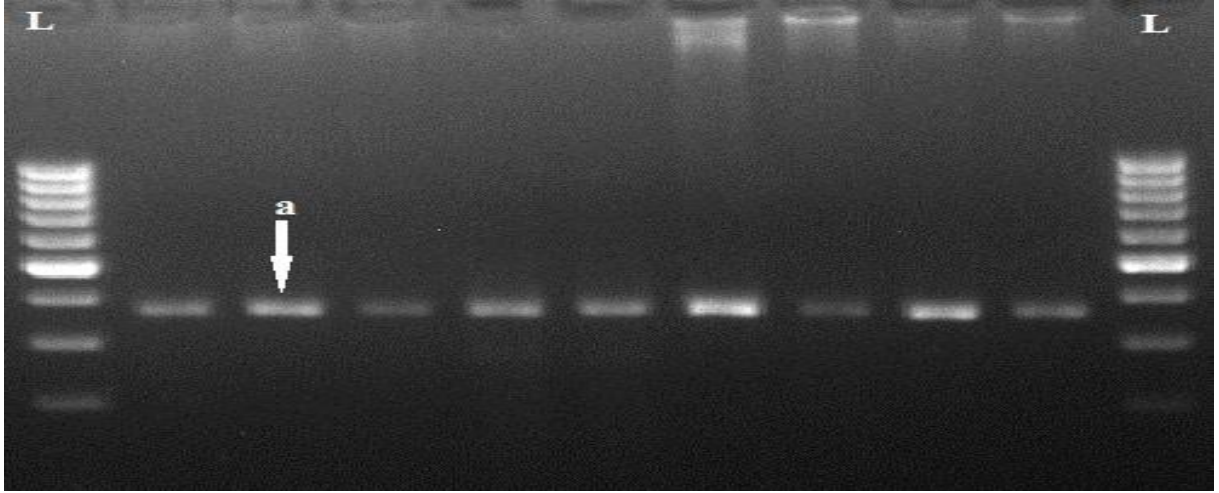
Şekil 10. TLR4 +399 tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *HaeIII* enzim kesim görüntüsü. L: DNA merdiveni (100 bp); a: 307 bp'lik kesim ürünü; b: 91 bp'lik kesim ürünü.

Ancak hem Holstein ırkı hem de yerli melezlerinde sadece CC genotipinin bulunduğu görülmüştür (Tablo 1).

3.3.3. Toll like reseptör 9 (TLR 9) Gen Polimorfizm Sonuçları

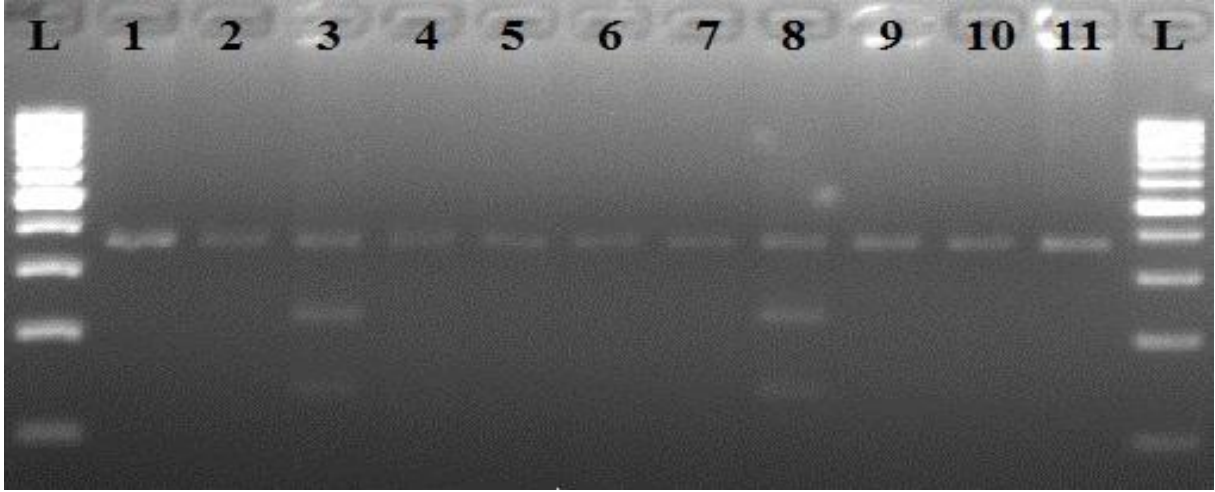
3.3.3.1. TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizmi

TLR9 +1310 G/A tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 392 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri en %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. TLR9 +1310 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 392 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü. L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

Elde edilen PCR ürünleri *Bse*RI endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda GG genotipindeki bireylerde 392 bp uzunluğunda tek bant, AA genotipindeki bireylerde 251 ve 141 bp uzunluğunda iki bant, GA genotipindeki bireylerde ise 392, 251 ve 141 bp uzunluğunda üç bant elde edilmesi beklenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. TLR9 +1310 G/A tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *BseRI* enzim kesim görüntüsü. L: DNA mediveni (100 bp); 2, 4-7, 9-11: GG genotipli bireyler; 3 ve 8: GA genotipli bireyler.

TLR9 +1310 G/A tek nükleotid polimorfizmi yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde GG genotipinin en çok görülen genotip olduğu (%100; %98.94 sırasıyla) görülmüştür. AA genotipi her iki ırkta da görülmemiştir (Tablo 1).

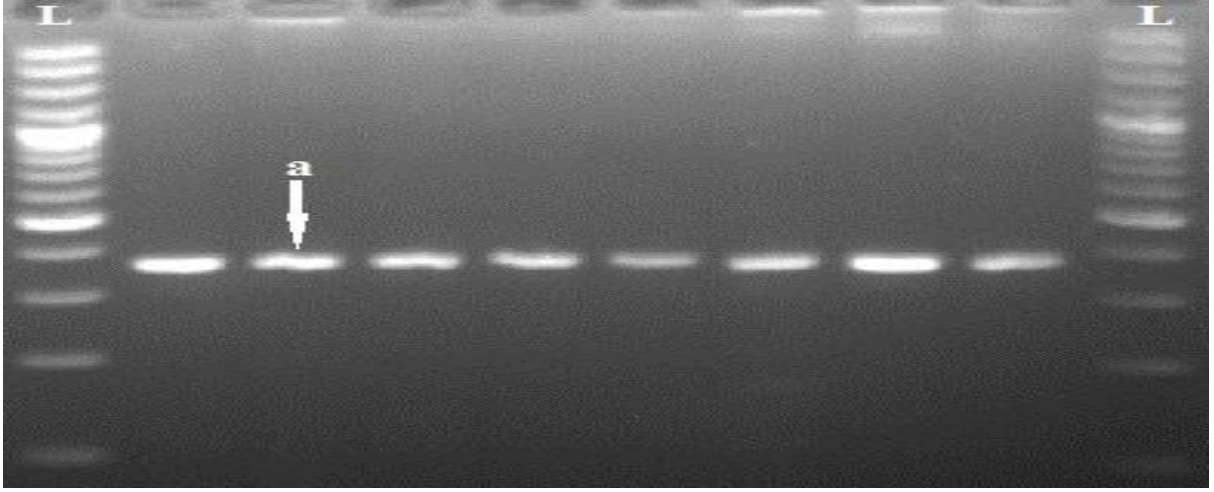
3.3.3.2. TLR9 A2700G tek nokta polimorfizmi

TLR9-A2700G tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak Sun ve ark. (2012) tarafından önerilen F: 5'-ATCTTCAACGACCTGACCCA -3'; R: 5'-AATCGCCAGACTTCCACCCT -3' olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. Ancak yapılan PCR işlemi sonunda literatürde belirtilen 362 bp uzunluğunda ki PCR ürünleri elde edilememiştir. Dolayısıyla çalışmada incelenen hiçbir örnek bu SNP yönünden genotiplenememiştir.

3.3.4. Solute Carrier Family 11, Member 1 (SLC11A1) +1066 C/G Tek Nokta Polimorfizm

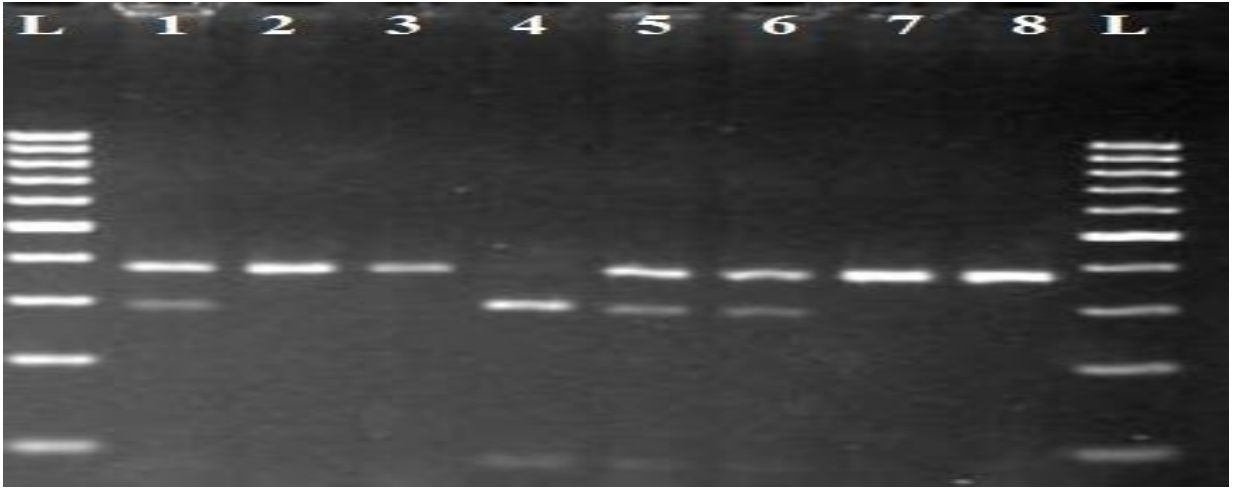
Sonuçları

SLC11A1 +1066 C/G tek nokta polimorfizmini belirlemek için yapılan PCR işlemi sonunda 374 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiş ve %2'lik agaraz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. SLC11A1 +1066 C/G tek nükleotid polimorfizmi için yapılan PCR işlemi sonunda elde edilen 374 bp (a) uzunluğunda ki PCR ürünlerinin görüntüsü. L: 100 bp'lik DNA merdiveni.

PCR ürünleri *Pst*I endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonunda elde edilen kesim ürünleri %3'lik agaroz jel elektroforezi ayrılarak incelenecek bireylerin genotipleri belirlenmiştir. Kesim sonunda CC genotipindeki bireylerde 374 bp uzunluğunda tek bant, GG genotipindeki bireylerde 293 ve 81 bp uzunluğunda iki bant, CG genotipindeki bireylerde ise 374, 293 ve 81 bp uzunluğunda üç bant elde edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. SLCA11A1 (+1066) C/G tek nükleotid polimorfizmi için yapılan *Pst*I enzim kesim görüntüsü. L: DNA mediveni (100 bp); 1, 5 ve 6: CG genotipli bireyler; 2, 3, 7 ve 8: CC genotipli bireyler; 4: GG genotipli birey.

SLCA11A1 (+1066) C/G tek nükleotid polimorfizmi yönünden incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hemde yerli melezlerinde CC genotipinin (%68.4; %69.25 sırasıyla) genotip olduğu, Holstein ırkında CG genotipinin (%11.22), yerli melezlerinde ise GG genotipinin (%12) en az

görülen genotipler olduğu görülmüştür. Ki-kare analizi sonucu her iki ırkın bu SNP yönünden Hardy-Weinberg dengesinde olmadıkları görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1 Holstein, yerli ve yerli melezlerinde incelenen SNP'ler yönünden allel ve genotip frekansları

SNP	İrk	n	Allele Frekansı		Genotip Frekansı (%)			χ^2 (df=1)
			A	G	AA	AG	GG	
TLR1 (1380)	HL	100	0.31	0.69	1 (1%)	60 (60%)	39 (39%)	16.2***
	YM	400	0.28	0.72	2 (%0.5)	219 (%54.75)	179 (%44.75)	52.31***
TLR1 (+1446)	HL	100	A	C	AA	AC	CC	60.87***
	YM	400	0.5	0.5	6 (6%)	89 (89%)	5 (5%)	240.48***
TLR1 (+1596)	HL	100	G	H	GG	GH	HH	1.44 ^{NS}
	YM	389	0.45	0.55	95	162	132	9.9**
TLR4 (+10)	HL	100	C	T	CC	CT	TT	0.01 ^{NS}
	YM	400	0.99	0.01	98 (98%)	2 (2%)	0	0.02 ^{NS}
TLR4 (+399)	HL	100	C	T	CC	CT	TT	-
	YM	400	1	0	100 (%100)	0	0	-
TLR9 (+1310)	HL	100	G	A	GG	GA	AA	0.01 ^{NS}
	YM	379	0.99	0.01	375 (%98.94)	4 (%1.06)	0	0.01 ^{NS}
SLCA11A1 (+1066)	HL	100	C	G	CC	CG	GG	51.5***
	YM	400	0.74	0.27	68 (68%)	11 (11%)	21 (21%)	78.2***

χ^2 : Ki-kare; HL: Holstein; YM: Yerli melezi; df: Serbestlik derecesi; **: İstatistiksel olarak önemli $p<0.01$; ***: İstatistiksel olarak önemli $p<0.001$; ^{NS}: İstatistiksel olarak önemsiz

3.3.5. Sığır IFNG (BoIFNG) Geninin 1. Eksonunda Bulunan 2781G/T Tek Nokta Polimorfizm Sonuçları

Bu amaçla Taq-Man genotiplleme probu dizayn edilmiştir. Bu amaçla sığır SNP veritabanında bulunan rs110725749 referans numaralı SNP bilgisi, prob dizayn eden firmaya gönderilmiştir. Firmanın ürettiği bu SNP ye özgü işaretlenmiş problemler ile incelenen bireylerin genotipleri Roche Light Cycler cihazı ile belirlenmesine çalışılmıştır. Ancak uluslar arası veri tabanlarından seçilerek hazırlanan bu prob çalışmamıştır. Bu nedenle çalışmada kullanılan hayvanların bu SNP yönünden genotiplmeleri yapılamamıştır.

3.3.6. Sığır Myd88 Myeloid Differentiation Primary Response (88) Geninin 1. Eksonunda Bulunan (A625C) Tek Nokta Polimorfizminin Belirlenmesi

Bu amaçla Capparelli ve ark. (2013) tarafından önerilen Taq-Man prob bilgisi ile bu SNP ye özgü işaretlenmiş VIC 5-TAGCAAGGGAGACATT-3 ve 6-carboxyfluorescein 5-TAGCAAGGGCGACATT-3 problemlerin sentezletilerek çalışmada kullanılan örneklerin bu SNP yönünden genotiplerinin belirlenmesi planlanmıştır. Ancak BoIFNG geninden bulunan 2781 G/T tek nokta polimorfizminde karşılaşılan problem nedeniyle, bu SNP için prob sentezletilmemesine karar verilmiştir. Bu nedenle Projenin başvuru aşamasında 85 646,72 TL olarak proje bütçesinin 51 586,68 TL'si kullanılmış ve 34 060,04 TL'sinin kullanılmamasına karar verilmiştir.

3.4. Genotipler-Fenotip (Tüberküloz ve Brusella Antikor Seviyeleri) İlişkileri

Yapılan çalışmada 100 Holstein, 151 Yerli Kara melezi ve 215 Doğu Anadolu Kırmızı melezinde MBAb ve IFN- γ testleri tüberküloz antikor seviyeleri ölçülmüştür. Analiz sonunda 47 baş yerli ve melezi (21 baş YM ve 26 baş DM) ile 26 baş saf Holstein'in tüberküloz pozitif olduğu görülmüştür. Irklar bazında tüberküloz pozitif ve negatif bireylerde incelenen SNP'ler yönünden genotip ve allel frekansları belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Irk bazında tüberküloz + ve – bireylerde allel ve genotip frekansları

TLR1 +1380 G/A									
Irk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				AA	AG	GG	A	G	
HL	99	26	Pozitif	-	16 (61.54%)	10 (38.46%)	0.31	0.69	5.14**
		73	Negatif	1 (1.37%)	44 (60.27%)	28 (38.36%)	0.32	0.68	11.48***
YM	151	21	Pozitif	-	10 (47.62%)	11 (52.38%)	0.24	0.76	2.05 ^{NS}
		130	Negatif		77 (59.23%)	53 (40.77%)	0.3	0.7	23.02***
DM	215	26	Pozitif	-	13	13	0.25	0.75	2.89 ^{NS}
		189	Negatif	2	101	86	0.28	0.72	20.82***

TLR1 +1446 C/A									
İrk	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)	
			AA	AC	CC	A	C		
HL	99	26	Pozitif	-	23 (88.46%)	3 (11.54%)	0.44	0.56	16.35***
		73	Negatif	-	67 (91.78%)	6 (8.22%)	0.46	0.54	52.51***
YM	151	21	Pozitif	1 (4.76%)	17 (80.95%)	3 (14.29%)	0.45	0.55	8.44**
		130	Negatif	9 (6.92%)	111 (85.39%)	10 (7.69%)	0.5	0.5	65.13***
DM	215	26	Pozitif	-	25	1	0.48	0.52	22.29***
		189	Negatif	1	172	16	0.46	0.54	130.72** *
TLR4 +10 C/T									
İrk	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)	
			CC	CT	TT	C	T		
HL	99	26	Pozitif	26 (100%)	-	-	1	0	-
		73	Negatif	71 (97.26%)	2 (2.74%)	-	0.99	0.01	0.01 ^{NS}
YM	151	21	Pozitif	21 (100%)	-	-	1	0	-
		130	Negatif	129 (99.23%)	1 (0.77%)	-	1	0	-
DM	215	26	Pozitif	26	-	-	1	0	-
		189	Negatif	185	4	-	0.99	0.01	0.01 ^{NS}
TLR1 +1596									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				GG	GH	HH	G	H	
HL	99	26	Pozitif	6 (23.08%)	17 (65.38%)	3 (11.54%)	0.56	0.44	2.75 ^{NS}
		73	Negatif	17 (23.29%)	35 (47.94%)	21 (28.77%)	0.47	0.53	0.11 ^{NS}
YM	151	21	Pozitif	6 (28.57%)	9 (42.86%)	6 (28.57%)	0.5	0.5	0.43 ^{NS}
		130	Negatif	29 (22.31%)	59 (45.38%)	42 (32.31%)	0.45	0.55	0.9 ^{NS}
DM	215	26	Pozitif	5 (19.23%)	11 (42.31%)	10 (38.46%)	0.4	0.6	0.38 ^{NS}
		189	Negatif	49 (25.93%)	69 (36.51%)	71 (37.56%)	0.44	0.56	12.76***

TLR9 +1310 G/A									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				GG	AG	AA	G	A	
HL	99	26	Pozitif	26 (100%)	-	-	1	0	-
		73	Negatif	73 (100%)	-	-	1	0	-
YM	151	21	Pozitif	21 (100%)	-	-	1	0	-
		130	Negatif	127 (97.69%)	3 (2.31%)	-	0.99	0.01	0.02 ^{NS}
DM	215	26	Pozitif	25 (96.15%)	1 (3.85%)	-	0.98	0.02	0.01 ^{NS}
		189	Negatif	186 (98.41%)	3 (1.59%)	-	0.99	0.01	0.01 ^{NS}

SLC11A1 +1066 C/G									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				CC	CG	GG	C	G	
HL	99	26	Pozitif	19 (73.08%)	1 (3.84%)	6 (23.08%)	0.75	0.25	20.94***
		73	Negatif	49 (67.12%)	9 (12.33%)	15 (20.55%)	0.73	0.27	34.27***
YM	151	21	Pozitif	15(71.42%)	3 (14.29%)	3 (14.29%)	0.79	0.21	6.69**
		130	Negatif	98 (75.39%)	22 (16.92%)	10 (7.69%)	0.84	0.16	18.31***
DM	215	26	Pozitif	21 (80.77%)	4 (15.38%)	1 (3.85%)	0.88	0.12	1.58 ^{NS}
		189	Negatif	116 (61.38%)	40(21.16%)	33 (17.46%)	0.72	0.28	42.75***

TLR1 +1380 polimorfizmi yönünden YM ve DM grubunun tüberküloz pozitif örnekler Hardy-Weinberg (HW) dengesinde iken diğer gruplarda HW dengesinin bozulduğu görülmüştür (Tablo 2). TLR1 +1446 polimorfizmi yönünden incelenen tüm ırk ve gruplarda HW dengesinin bozulduğu görülmüştür (Tablo 2). TLR4 +10 polimorfizmi yönünden incelenen tüm ırk ve gruplarının monomorfik oldukları bozulduğu görülmüştür (Tablo 2). TLR1 +1596 polimorfizmi önünden DM grubundaki negatif bireyler hariç tüm grupların HW dengesinde oldukları görülmüştür (Tablo 2). TLR9 +1310 polimorfizmi yönünden HL ırkına ait tüm gruplar monomorfikken, YK ırkında pozitifler monomorfik, diğer gruplarda ise GG genotipinin en yaygın genotip olduğu ve AA genotipinin hiçbir grupta bulunmadığı görülmüştür (Tablo 2). SLC11A1 +1066 polimorfizmi yönünde DM pozitif grubu dışında incelenen tüm ırk ve grupların HW dengesinden ayrıldıkları görülmüştür (Tablo 2).

Yapılan çalışmada 151 Yerli Kara melezi ve 215 Doğu Anadolu Kırmızı melezinde Brucella-Ab C-ELISA testi ile brusella antikor seviyeleri ölçülmüştür. Analiz sonunda 4 baş Yerli Kara melezi ile 12 baş Doğu Anadolu Kırmızı melezinin brusella pozitif olduğu, incelenen 100 baş Holstein'de beusella pozitif bireyin bulunmadığı görülmüştür. Irklar bazında tüberküloz pozitif ve negatif bireylerde incelenen SNP'ler yönünden genotip ve allel frekansları belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Irk bazında brusella + ve – bireylerde allel ve genotip frekansları

TLR1 +1380 G/A									
Irk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				AA	AG	GG	A	G	
YM	151	4	Pozitif	-	3 (75%)	1 (25%)	0.38	0.63	1.44
		147	Negatif	-	84 (57.14%)	63 (42.86%)	0.29	0.71	23.52
DM	227	12	Pozitif	-	6 (50%)	6 (50%)	0.25	0.75	1.33
		215	Negatif	2 (0.93%)	114 (53.02%)	99 (46.05%)	0.27	0.73	23.62

TLR1 +1446 C/A									
Irk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				AA	AC	CC	A	C	
YM	151	4	Pozitif	1 (25%)	3 (75%)	-	0.63	0.38	1.44
		147	Negatif	9 (6.12%)	125 (85.04%)	13 (8.84%)	0.49	0.51	72.43
DM	227	12	Pozitif	-	10 (83.3%)	2 (16.7%)	0.42	0.58	6.12
		215	Negatif	1 (0.46%)	197 (91.63%)	17 (7.91%)	0.46	0.54	152.7

TLR4 +10 C/T									
Irk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				CC	CT	TT	C	T	
YM	151	4	Pozitif	4	-	-	1	-	-
		147	Negatif	146 (99.32%)	1 (0.68%)	-	1	-	-
DM	227	12	Pozitif	12 (100%)	-	-	1	-	-
		215	215	211 (98.14%)	4 (1.86%)	-	0.99	0.01	0.02

TLR1 +1596									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				GG	GH	HH	G	H	
YM	151	4	Pozitif	-	-	4 (100%)	-	1	-
		147	Negatif	35 (23.81%)	64 (43.54%)	48 (32.65%)	0.46	0.54	2.2
DM	227	12	Pozitif	5 (41.67%)	2 (16.66%)	5 (41.67%)	0.5	0.5	5.33
		215	Negatif	54 (25.12%)	80 (37.21%)	81 (37.67%)	0.44	0.56	12.79

TLR9 +1310 G/A									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				GG	AG	AA	G	A	
YM	151	4	Pozitif	4	-	-	1	-	-
		147	Negatif	144 (97.96%)	3 (2.04%)	-	0.99	0.01	0.02
DM	227	12	Pozitif	12 (100%)	-	-	1	-	-
		215	Negatif	211 (98.14%)	4 (1.86%)	-	0.99	0.01	0.02

SLC11A1 +1066 C/G									
İrk	n	n	TB	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Ki-Kare Analizi (Sd=1)
				CC	CG	GG	C	G	
YM	151	4	Pozitif	3 (75%)	-	1 (25%)	0.75	0.25	4
		147	Negatif	110 (74.84%)	25 (17%)	12 (8.16%)	0.83	0.17	22.1
DM	227	12	Pozitif	7 (58.3%)	4 (33.3%)	1 (8.4%)	0.75	0.25	0.15
		215	Negatif	137 (63.72%)	44 (20.47%)	34 (15.81%)	0.74	0.26	47.25

3.5. Tüberküloz ve brusella hastalıkları ile genotipler arasındaki ilişkinin araştırılması

Yerli ırklarda incelenen TLR1, TLR4 ve TLR9 ait SNP'lerde tüberküloz görülme oranları bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak, SLCA11A1 (1066) SNP'si bakımından YK ve DAK ırklarında genotiplere göre tüberküloz görülme oranları istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Buna göre tüberküloz görülme oranı DAK'da GG

genotipine göre CC genotipini taşıyan sığırlarda 4.13 kat, CG genotipini taşıyanlarda ise 3.51 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. DAK için tek değişkenli lojistik regresyon modelleri

SNP	Genotipler	$\hat{\beta}$	SE($\hat{\beta}$)	Wald	P Değeri	OR	OR'nin %95 Güven Aralığı	
TLR9 (+1310 G/A)	GG (Referans)					1.000		
	GA	2.018	1.430	1.990	0.158	7.520	0.456	124.040
	Sabit	-2.018	0.213	89.820	<0.001	0.133		
TLR1 (+1380 G/A)	GG (Referans)					1.000		
	AA	-19.245	28420.720	0.000	0.999	0.000	0.000	-
	AG	-0.028	0.420	0.005	0.947	0.972	0.427	2.214
TLR1 (+1446 C/A)	Sabit	-1.958	0.308	40.303	0.000	0.141	0.427	2.214
	CC (Referans)					1.000		
	AA	-19.006	20096.485	0.000	0.999	0.000	0.000	-
TLR1 (+1596 G/H)	AC	0.257	0.777	0.110	0.740	1.293	0.282	5.927
	Sabit	-2.197	0.745	8.690	0.003	0.111		
	HH (Referans)					1.000		
SLC11A1 (+1066C/G)	GG	-0.061	0.558	0.012	0.913	0.941	0.315	2.809
	GH	0.288	0.481	0.358	0.550	1.333	0.520	3.421
	Sabit	-2.079	0.354	34.593	<0.001	0.125		
SLC11A1 (+1066C/G)	GG (Referans)					1.000		
	CC	1.418	1.047	1.833	0.176	4.127	0.530	32.131
	CG	1.257	1.125	1.248	0.264	3.514	0.387	31.863
SLC11A1 (+1066C/G)	Sabit	-3.258	1.019	10.222	0.001	0.038		

YK'da ise tüberküloz görülme oranları GG genotipine göre CC genotipini taşıyan sığırlarda 0.8 kat, CG genotipini taşıyan sığırlarda ise 0.34 kat daha az bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. YK için Tek değişkenli lojistik regresyon modelleri

SNP	Genotipler	$\tilde{\beta}$	SE($\tilde{\beta}$)	Wald	P Değeri	OR	OR'nin %95 Güven Aralığı	
TLR9 (+1310 G/A)	GG (Referans)					1.000		
	GA	-19.486	23205.42	0.000	0.999	0.000	0.000	-
	Sabit	-1.717	0.226	57.447	<0.001	0.180		
TLR1 (+1380 G/A)	GG (Referans)					1.000		
	AG	-0.379	0.453	0.700	0.403	0.684	0.282	1.664
	Sabit	-1.54	0.318	23.451	<0.001	0.214		
TLR1 (+1446 C/A)	CC (Referans)					1.000		
	AA	-0.288	1.333	0.047	0.829	0.75	0.055	10.233
	AC	-0.254	0.818	0.096	0.756	0.776	0.156	3.858
	Sabit	-1.504	0.782	3.702	0.054	0.222		
TLR1 (+1596 G/H)	HH (Referans)					1.000		
	GG	0.129	0.635	0.041	0.839	1.138	0.328	3.949
	GH	0.102	0.523	0.038	0.845	1.108	0.398	3.087
	Sabit	-1.815	0.408	19.838	<0.001	0.163		
SLC11A1 (+1066 C/G)	GG (Referans)					1.000		
	CC	-0.209	0.616	0.115	0.735	0.812	0.243	2.713
	CG	-1.079	0.921	1.371	0.242	0.340	0.056	2.069
	Sabit	-1.447	0.556	6.779	0.009	0.235		

Tüberküloz şüpheli incelenen; Holştayn ırkı ineklerde TLR1 (+1596 G/H) SNP'sine ait genotipler ile tüberküloz görülme oranları lojistik regresyon analizine göre incelendiğinde; tüberküloz görülme oranları HH genotipine göre, GG genotipini taşıyan sığırlarda 2.58 kat, GH genotipini taşıyan hayvanlarda ise 3.52 kat daha fazla bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 6. Holştayn için Tek değişkenli lojistik regresyon modelleri

SNP	Genotipler	$\hat{\beta}$	SE($\hat{\beta}$)	Wald	P Değeri	OR	OR'nin %95 Güven Aralığı	
TLR1 (+1380 G/A)	GG (Referans)					1.000		
	AA	-20.138	40192.97	0.000	1.000	0.000	0.000	
	AG	0.053	0.469	0.013	0.910	1.055	0.421	2.643
	Sabit	-1.065	0.367	8.429	0.004	0.345		
TLR1 (+1446 C/A)	CC (Referans)					1.000		
	AC	-0.391	0.747	0.274	0.601	0.676	0.156	2.925
	Sabit	-0.693	0.707	0.961	0.327	0.500		
	HH (Referans)					1.000		
TLR1 (+1596 G/H)	GG	0.951	0.777	1.497	0.221	2.588	0.564	11.876
	GH	1.27	0.683	3.461	0.063	3.562	0.934	13.579
	Sabit	-1.992	0.615	10.48	0.001	0.136		
	GG (Referans)					1.000		
SLC11A1 (+1066 C/G)	CC	-0.031	0.554	0.003	0.955	0.969	0.328	2.868
	CG	-1.386	1.155	1.441	0.23	0.250	0.026	2.403
	Sabit	-0.916	0.483	3.598	0.058	0.400		
	GG (Referans)					1.000		

Yerli Kara melezleri ve Doğu Anadolu Kırmızısı melezlerinde incelenen genotipler ile brucella hastalığı görülme oranı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi

Proje başvurusu sırasında, çalışmanın hayvan materyali olarak Türkiye yerli sığır ırklarından Doğu Anadolu Kırmızısı (dişi ve erkek), Yerli Kara (dişi ve erkek), bunların melezleri ve Holstein ırkına ait toplam 500 baş sığır (bu rakamın en az 250 başını yerli ve melezleri) oluşturması, kan numunelerinin ise Kayseri ve çevre illerdeki mezbahalardan toplanması planlanmıştır. Çalışmada 100 baş Holstein ırkı sığırdan ve 400 baş yerli ve melezlerinden kan örnekleri alınmıştır. Kit ile yapılan DNA izolasyonu ile kan örneklerinin hepsinden başarılı bir şekilde DNA'lar izole edilmiştir.

Daha sonra elde edilen DNA'lar TLR1, TLR4, TLR9 ve SLC11A1 genlerinde bulunan SNP'ler yönünden bireylerin genotiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan PCR işleminde kullanılmıştır. PCR işlemlerindeki olası sorunların önlenmesi amacıyla, proje başvurusunda protokolü yazılan PCR işlemleri yapılmadan önce her SNP için Gradient PCR'ı yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri uygun enzimler ile kesilerek her SNP yönünden incelenen sığır ırklarının genotipleri başarıyla belirlenmiştir.

4.2. TLR1, TLR4, TLR9 ve SLC11A1 Genotip-Allel Frekansları, Genotip-Fenotip İlişkileri

Yapılan projede seçilen genler, özellikle doğal bağışıklık olmak üzere kazanılmış bağışıklığın oluşmasında katılan genler arasından seçilmiştir. Çiftlik hayvanlarında ve insanlarda tüberküloz ve brusella gibi iki önemli zoonoz hastalığa karşı dayanıklılığın araştırıldığı çalışmalarda bu genler kullanıldığı için (Bafica ve ark., 2005; Paixao ve ark., 2006; Capparelli ve ark., 2007; Martínez ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2011; Uciechowski ve ark., 2011) bizde çalışmamıza TLR1, TLR4, TLR9 ve SLC11A1 genlerini seçtik. Seçilen SNP'ler ise Prakash ark. (2014) tarafından Hindistan yerli sığır ırklarında brucella hastalığına karşı dayanıklılık ile ilişkili SNP'lerin araştırıldığı çalışma ile Sun ve ark. (2014) tarafından Holstein ırkında tüberküloza dayanıklılık ilişkili SNP'leri araştırıldığı çalışmalarda bu hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilen SNP'ler arasından seçilmiştir. Bu sayede hem yerli ırklarımızda bu SNP'ler ile tüberküloz ve brusellaya yakalanma arasında ilişki var mı? yok mu? hem de belirtilen çalışma sonuçlarının incelenen ırklara özgü mü? Veya incelenen popülasyonlara özgü mü? Sorularına cevap aranmıştır. Ayrıca projenin bir diğer amacı olan incelenen ırklar bu SNP'ler yönünden genetik dengede mi? değil mi? sorusunda cevap aranmıştır.

4.2.1. TLR1 +1380 G/A

Bu SNP yönünden projede genotiplenen Holstein ırkı sığırlarda (%1) ve yerli melezlerinde (%0.5) ile AA genotipinin en düşük frekanstaki genotip olduğu görülmüştür. AG genotipinin hem Holsteinlerde (%59.2) hem de yerli melezlerinde (%54.75) en yüksek frekansa sahip genotip olduğu görülmüştür. Yapılan ki-kare analizinde incelenen her iki ırkında bu SNP yönünden Hardy-Weinberg dengesinde olmadıkları görülmüştür. Bunun sebebinin Holsteinlerde yapılan seleksiyon çalışmalarının, yerlilerde ise melezlemelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hindistan'da yetiştirilen 83 baş yerli ve yerli melezinin bu SNP ve sığır brusellozu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada incelenen örneklerde bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde AG genotipinin en yüksek frekansa (%59) sahip

olduğu, AA genotipinin ise en az görülen (%8.4) genotipi olduğu bildirilmiştir (Prakash ve ark., 2014).

Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada GG genotip frekansının brusellalı hayvanlarda (%52.3) sağlıklılarından (%15.6) yüksek olduğu ve TLR1 +1380 G/A polimorfizmi yönünden sığır brucellozu ile GG genotipi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Ancak, Türkiye’de yetiştirilen Holstein ve yerli melezlerinde TLR1 +1380 G/A polimorfizmi ile tüberküloz ve brusella hastalığı arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bunun hasta hayvan sayısı veya ırklarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çünkü Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada *Bos indicus* kökenli zebu ırkları incelenmiştir. Ancak bu çalışmada *Bos taurus* kökenli üç gerçek sığır ırkı incelenmiştir (Holstein, Doğu Anadolu Kırmızısı melezi ve Yerli Kara melizi). Dolayısıyla bu SNP’nin ırk spesifik olabileceği veya her genotipteki birey sayısının yetersiz olmasından dolayı böyle bir sonucun bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada AA genotipi hem sağlıklı hemde brusellalı hayvanlarda bulunmuşken, bizim çalışmamızda tüberküloz hastalığı yönünden hasta-sağlıklı incelenen 465 hayvandan sadece 3’ünün AA genotipinde, brusellalı hayvanlarda ise hiç görülmemiştir.

4.2.2. TLR1 +1446 C/A

Çalışmada incelenen Holstein ırkı sığırlarda AA genotipinde her hangi bir bireye rastlanılmamıştır. Ancak yerli melezlerinde çok düşük frekansta olmasına rağmen (%3) bu SNP yönünden AA genotipli bireylere rastlanılmıştır. AC genotipi hem Holsteinlerde hem de yerli melezlerinde (%91, %88.5 sırasıyla) en yüksek frekanstaki genotip olduğu belirlenmiştir. Hindistan’da yetiştirilen yerli sığır ırklarında yapılan çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde AA genotipinin en düşük frekansa sahip olduğu (%1.2), AC genotipinin ise en yaygın genotip olduğu (%71.1) görülmüştür (Prakash ve ark., 2014). Hem bizim çalışmamız hem de Prakash ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarına göre 1446 C/A SNP’si yönünden AA genotip frekansının en düşük olması ve en yaygın genotipinde AC olması durumunun gerçek sığır türüne özgü bir durum olduğu düşünülmektedir.

Prakash ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada TLR1 +1446 C/A kodlu SNP ile sığır brucellozu arasında ilişki olduğu CC genotipinin brusellalı bireylerde, sağlıklılara göre daha çok görüldüğü bildirilmiştir. Ancak, Türkiye’de yetiştirilen Holstein ve yerli melezlerinde TLR1 +1446 C/A polimorfizmi ile tüberküloz ve brusella hastalığı arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bunun hasta hayvan sayısı veya ırklarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çünkü Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada *Bos indicus* kökenli zebu ırkları incelenmiştir. Ancak bu çalışmada *Bos taurus* kökenli üç gerçek sığır ırkı incelenmiştir (Holstein, Doğu Anadolu Kırmızısı melezi ve Yerli Kara melizi). Dolayısıyla bu SNP'nin ırk spesifik olabileceği veya her genotipteki birey sayısının yetersiz olmasından dolayı böyle bir sonucun bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada AA genotipi en az görülen genotip olduğu bildirilmişken, AC ve CC genotipleri hem sağlıklı hemde brusellalı hayvanlarda bulunmuşken, bizim çalışmamızda tüberküloz hastalığı yönünden hasta-sağlıklı incelenen 465 hayvandan sadece AC genotipinin en yaygın genotip olduğu ve bu SNP yönünden her iki grupta Hardy-Weinberg dengesinin bozulduğu görülmüştür.

4.2.3. TLR1 1596 G/A

Proje kapsamında incelenen sığır ırklarının bu SNP yönünden polimorfik oldukları görülmüştür. İncelenen Holstein ve yerli melezi örneklerinde GH genotipinin en yaygın genotip olduğu görülmüştür (%52.52; %41.65 sırasıyla). İncelenen örneklerden Holstein ırkının bu SNP yönünden Hardy-Weinberg (HW) dengesinde oldukları görülmüşken, yerli melezlerinin HW dengesinden saptıkları görülmüştür. Yerli melezlerinin HW dengesinden sapmasının sebebinin yerli sığır ırklarındaki sayısal azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sun ve ark. (2012) tarafından yapılan ve Çin'de yetiştirilen 586 baş Holsteinde bu çalışmada incelenen SNP ile tüberküloz hastalığı arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada bizim çalışmamızdakine benzer şekilde GH genotip frekansının (%46.4) en yüksek olduğu ve incelen Holstein örneklerinin bizim çalışmamızdaki gibi HW dengesinde oldukları bildirilmiştir. Her iki çalışmada Holstein ırkının bu SNP yönünden genetik olarak dengede olduğunu göstermektedir.

Sun ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada TLR1 1596 G/A kodlu SNP ile sığır tüberkülozu arasında ilişki olduğu GG genotipinin Holsteinlerde tüberküloza dayanıklılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak Türkiye'de yetiştirilen Holstein ve yerli melezlerinde TLR1 1596 G/A polimorfizmi ile tüberküloz ve brusella hastalığı arasında ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada ise belirlenen genotipler ile hastalıklar arasında bir ilişki belirlenememiştir. Bununda incelenen hayvan sayısı ile her genotipte bulunan hasta/sağlıklı birey sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü Sun ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada hasta (154), sağlıklı (432) toplam 586 baş Holstein sığır değerlendirilmiştir. Türkiye'de Tarım Bakanlığı ile işbirliği yapılmadan bu sayıda tüberküloz pozitif hayvanın bulunmasındaki zorluk nedeniyle ilişki bulunamadığı düşünülmektedir.

İncelenen ırkların TLR1 1596 G/A SNP'si yönünden genetik dengede olmasında hem sağlıklı hemde özellikle hasta hayvan sayısının artırılması ile bu SNP ile tüberküloz hastalığı arasında ilişkinin ortaya konabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde brusella hastalığına duyarlılık ile TLR1 1596 G/A SNP'si arasında ilişkinin bulunabileceği düşünülmektedir.

4.2.4. TLR4 +10 C/T

Çalışmada genotiplemesi yapılan Holstein ve yerli melezlerinde TT genotipine rastlanılmamıştır. Diğer taraftan incelenen Holstein ve yerli melezlerinde CT genotipi bireylerin bulunmasına rağmen, frekansının (%2.03 ve %1.3 sırasıyla) oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmada incelenen her grupta da CC genotipi her iki grupta da (HL: %97.97 ve yerli melezlerinde: 98.5) en yüksek genotip olduğu belirlenmiştir. Aynı SNP ile Hindistan'da yerli sığırlarında bu SNP'nin incelendiği çalışmada, incelenen örneklerde bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde CC genotipinin en yüksek frekansa (%49.4) sahip genotip olduğu bildirilmiştir. Ancak bizim çalışmalarımızdan farklı olarak CT genotip frekansının da yüksek olduğu (%48.2) bildirilmiştir. Diğer taraftan çok düşük frekansta da olmasına rağmen TT genotipili bireylerde rastlandığı bildirilmiştir (Prakash vd., 2014). Bu durumun her iki çalışmada incelenen sığır ırklarının kökenleri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Prakash ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada TLR1 +10 C/T kodlu SNP ile sığır brusellozu arasında ilişkinin araştırıldığı çalışmada, bu SNP ile sığır brusellozu arasında ilişki olduğu ve TT genotipine sağlıklı bireylerde rastlanılmamışken hasta hayvanlarda bu genotipin frekansının %2.41 olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada CT genotipi her iki grupta da bulunmasına rağmen hasta bireylerde %13.16 olarak bulunmuşken, kontrol grubunda ise %77.8 gibi oldukça yüksek frekansa sahip olduğu ve bu SNP ile brusella hastalığının görülmesi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Prakash ve ark., 2014). Ancak bu çalışmada *Bos taurus* kökenli üç gerçek sığır ırkı incelenmiştir (Holstein, Doğu Anadolu Kırmızısı melezi ve Yerli Kara melizi). Dolayısıyla bu SNP'nin ırk spesifik olabileceği veya her genotipteki birey sayısının yetersiz olmasından dolayı böyle bir sonucun bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü Prakash ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada her üç genotipinde incelenen örneklerde bulunduğu bildirilmişken, bizim çalışmamızda incelenen *Bos taurus* kökenli sığır ırklarının üçünde tamamen CC genotipinde olduğu ve TT genotipinin incelenen örneklerin hiçbirinde bulunması görülmüştür.

4.2.5. TLR4 +399 C/T

Çalışmada incelenen Holsteinlerin ve yerli melezlerinin bu SNP yönünden monomorfik olduğu ve incelenen örneklerin hepsinin CC genotipinde oldukları belirlenmiştir. Holsteinlerin ve yerli melezlerinin bu SNP yönünden monomorfik olmalarının incelenen örnek sayısı ile ilişkili olabileceği veya ırka özgü bir durum olabileceği düşünülmüştür. Çünkü Prakash ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada Hindistan’da yerli sığırlarını inceledikleri çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak CC genotip frekansının en yüksek olduğu (%91.6) buna karşılık CT genotipli örneklerinde bulunduğu bildirilmiştir. TT genotipin bizim çalışmamıza benzer şekilde incelenen örneklerde bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda incelenen örneklerin hepsinin CC genotipinde olmaları nedeniyle Ki-kare analizi yapılamamıştır.

Prakash ve ark. (2014) bu SNP ile sığır burusellozu arasında ilişkinin araştırıldığı çalışmalarında CT genotipi ile sağlıklılık arasında ilişki olabileceği bildirilmiştir. Ancak bizim araştırmamızda incelenen örneklerini hepsinin CC genotipinde olmaları nedeniyle genotip-fenotip (brusella ve tüberküloz hastalıklarına direnç) arasında ilişki araştırılamamıştır.

4.2.6. TLR9 +1310 G/A

Çalışmada incelenen Holstein ırkı sığırların bu SNP yönünden monomorfik olduğu ve incelenen örneklerin hepsinin GG genotipinde oldukları belirlenmiştir. Yerli melezlerinde ise GG genotipinin en yaygın genotip (%98.94) olmasına rağmen GA genotipli bireylerde rastlanıldığı (%1.06) görülmüştür. İncelenen her iki ırkta da AA genotipli bireylere rastlanılmamıştır. Holsteinlerin bu SNP yönünden monomorfik olmalarının incelenen örnek sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Prakash ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada Hindistan’da yerli sığırlarını inceledikleri çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde AA genotipine rastlanışmamıştır. Ancak GG genotip frekansı (%53) ile GA genotip frekansı (%47) birbirine yakın bulunmuştur.

Prakash ve ark. (2014) bu SNP ile sığır burusellozu arasında bir ilişki bulamamışlardır. Türkiye’de yetiştirilen Holstein ve yerli melezlerinin incelendiği bu çalışmada incelenen Holstein örneklerinin bu SNP yönünden monomorfik olmaları, yerli melezlerinin ise %98,64 oranında GG genotipinde olmaları nedeniyle bu SNP ile tüberküloz ve brusella hastalıkları arasında ilişki olup olmadığı araştırılamamıştır.

4.2.7. SLC11A1 +1066 C/G

Çalışmada incelenen hem Holstein ırkı sığırlarda hem de yerli melezi sığırların SLC11A1 +1066 C/G SNP'si yönünden polimorfik oldukları görülmüştür. Holsteinlerde ve yerli melezlerinde CC genotip frekansının en yaygın olduğu (%68.4; %69.25 sırasıyla) görülmüştür. Holsteinlerde CG (%11.22), yerli melezlerinde ise GG (%12) genotipinin en az görülen genotipler olduğu görülmüştür. İncelenen her iki grubunda HW dengesinden saptıkları görülmüştür. Bununda yapılan seleksiyon çalışmaları ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Prakash ve ark. (2014) tarafından Hindistan'da yetiştirilen yerli sığırlarda bu SNP ve sığır brucellozu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada incelenen örneklerde bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde üç genotipinde bulunduğu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmadan farklı olarak Hindistan yerli sığır ırklarında CC genotip frekansının (%9.64) en düşük genotip olduğu, CG genotipinin ise en yüksek frekansa (%53) sahip olduğu bildirilmiştir.

Prakash ve ark. (2014) tarafından Hindistan yerli sığır ırklarında SLC11A1 +1066 C/G SNP'si ile sığır brusellası arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, brucellalı hayvanlarda C allel frekansının sağlıklılara göre oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de yetiştirilen Holstein ve yerli melezlerinde SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi ile tüberküloz ve brusella hastalığı arasında ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada ise genotipler ile hastalıklar arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bunun sebebinin kullanılan SNP'nin ya ırka özgü olmasından ya da hastalığa özgü olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü Prakash ve ark. (2014) Hindistan yetiştirilen *Bos indicus* kökenli sığır ırklarında SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi ile brusellas arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bizim çalışmamızda ise incelenen her üç grupta *Bos taurus* kökenli sığır ırklarıdır. Diğer taraftan Prakash ve ark. (2014) hasta (38) ve sağlıklı (49) olmak üzere toplam 87 hayvan incelemişlerdir. Yani hasta sağlıklı oranı dengelidir. Bizim çalışmamız da ise ancak 16 brusella pozitif hayvan inceleyebildik. Diğer taraftan bu SLC11A1 geninde bulunan farklı SNP'ler ile farklı sığır ırkları (Paixão ve ark., 2012) ve farklı çiftlik hayvanlarında ki brusella hastalığına (Borriello ve ark., 2006; le Roex ve ark., 2013) duyarlılık arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sığırlarda brusella gibi başka bir hücre içi patojeni olan paratüberküloz etkeni *Mycobacterium paratuberculosis*'in sebep olduğu paratüberküloz hastalığına duyarlılık ile SLC11A1 geninde bulunan farklı SNP'ler arasında ilişki olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (Capparelli ve ark., 2007; Pinedo ve ark., 2009). Bu çalışmada da bir başka hücre içi patojeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'in sebep olduğu sığır tüberkülozu hastalığına duyarlılık ile SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi arasında ilişki araştırılmıştır. İncelenen sığır ırklarından Holsteinlerde bu

polimorfizm ile tüberküloz hastalığına duyarlılık arasında ilişki bulunamamışken, Yerli melezlerinde SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi ile tüberküloz hastalığının görülme sıklığı arasında ilişki olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada incelenen Doğu Anadolu melezlerinde GG genotipli bireylerden tüberküloz hastalığının görülme sıklığının CC genotiplilerden 4.13 kat, CG genotiplilerden ise 3.51 kat daha fazla görüldüğü belirlenmiştir. Bu durum ise SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi ile tüberküloz hastalığına duyarlılık ilişkisi olabileceği düşündürmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışma sonunda SLC11A1 +1066 C/G polimorfizmi ile sığır tüberkülozuna duyarlılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur. TLR1 1596 polimorfizmi ile sığır tüberkülozuna duyarlılıkla ilişkili olmadığı görülmüştür. Ancak bu durumun, çalışmada incelenen hasta hayvan sayısının azlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Makrofaj hücrelerinde bulunan lizozom ve endozomların zarlarında bulunan SLC11A1 proteininin, transportla ilgili olarak görev yaptığı bilinmektedir. Bu genin brusella ve paratüberküloz gibi diğer bazı hücre içi patojenlerine duyarlılıkla da ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle SLC11A1 proteinini kodlayan genin hem sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olması hemde önemli zoonozlar olası nedeniyle sığırlarda tüberküloz hastalığına dayanıklılığın artırılması çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan her ne kadar aralarında ilişki bulunmasına rağmen TLR1 1596 polimorfizminin Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile koordineli olarak daha fazla örnekte test edilmesinin sığır tüberkülozunun ülkemizde eradikasyon çalışmalarında katkısı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma yerli sığır ırkları ve bunların melezlerinde tüberkülozun seroprevalansı konusunda yapılmış ilk çalışma olması ve tüberküloz hastalığına duyarlılık ile kullanılan SNP'ler arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışma olması açısından da önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Adams LG, Schutta CJ (2010) Natural resistance against brucellosis: A review. Open Vet Sci J, 4: 61-71.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 4: 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124: 783-801.

- Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis: A Review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. Clin Lab, 49 (9-10): 487-505.
- Alpan O (1993). Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği, Medisan Yayınevi, 3. Baskı s: 48, Ankara.
- Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, Vordermeier M (2007). High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. Clin Vaccine Immunol, 14: 1356-1361.
- Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JG, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Bapuerto F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae subsp. nov.: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol, 49: 1263-1273.
- Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Experimental Medicine, 202(12): 1715-1724.
- Barthel R, Feng J, Piedrathia JA, McMurray DN, Templeton JW, Adams G (2001). Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: Effect on *Brucella abortus* survival. Infection and immunity, 69: 3110-3119.
- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, Ercolini D, Parisi A, Roperto S, Iannelli D (2006). Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Infection and Immunity, 74: 2115-2120.
- Behr MA (2001). A historical and molecular phylogeny of BCG strains. Vaccine, 17: 915-922.
- Capparelli R, Alfano F, Amoroso MG, Borriello G, Fenizia D, Bianco A, Roperto S, Roperto, F, Iannelli D (2007). Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Infection and immunity, 75(2): 988-996.
- Coussens PM, Colvin CJ, Wiersma K, Abouzied A, Sipkovsky S (2002). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Infect Immun, 70: 5494-5502.

- Egger-Danner C, Cole JB, Pryce JE, Gengler N, Heringstad B, Bradley A, Stock KF (2015). Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, 9(2): 191-207.
- Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res*, 6: 956-964.
- Finlay EK, Berry DP, Wickham B, Gormley EP, Bradley DG (2012). A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. *PLoS One*, 7(2): e30545.
- Forbes JR, Gros P (2003). Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood*, 102: 1884-1892.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL (2007). Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 7: 775-786
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe M, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 7877-7882.
- Gibson JP, Bishop SC (2005). Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: A global approach. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(1): 343.
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P (1997). Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*, 185(4): 717-730.
- Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guet C, Briere F, Vlach J, Lebecque D, Trinchieri G, Bates EEM (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, 174: 2942-2950.
- Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NT, Quy HT, Chau TT, Rodrigues S, Nachman A, Janer M, Hien TT, Farrar JJ, Aderem A (2007). A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol*, 37: 2280-2289.

- Hodul M, Gümüşsoy KS (2009). Develi yöresinde sığır brusellozunun serolojik testlerle (RBPT, SAT, C-ELISA, CFT) teşhisi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 18(3): 167-174.
- Horin P, Rychlik I, Templeton JW, Adams G (1999). A complex pattern of micro-satellite polymorphism within the bovine SLC11A1 gene. Eur J Immunogenet, 26: 311-313.
- Hussain T (2007). Leprosy and tuberculosis: An insight-review. Crit Rev Microbiol, 33(1): 15-66.
- Ibeagha-Awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, Bannerman DD, Paape MJ, Zhao X (2008). Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Research, 39(2): 1-12.
- Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezbai N, Arduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17: 354-359.
- İca T, Aydın F, Gümüşsoy KS, Perçin D, Sümerkan AB, Ocak F, Abay S, Doğan HO, Fındık A, Ciftci A (2012). Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 59(4): 259-264.
- İyisan AS, Akmaz O, Gökçen Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmirli S, Güler L, Gündüz K, Işık N, İcyerioğlu AK, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu S, Tuna I, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S (2000). Türkiye’de sığır ve koyunlarda brusellozis’in seroepidemiolojisi. Pendik Vet Mikrobiol Derg, 31(1): 21-75.
- Kataria RS, Tait Jr RG, Kumar D, Ortega MA, Rodriguez J, Reecy J M (2011). Association of toll-like receptor four single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle. Immunogenetics, 63: 115-119.
- Kumar N, Ganguly I, Singh R, Deb SM, Kumar S, Sharma A, Mitra A (2011). DNA polymorphism in SLC11A1 gene and its association with brucellosis resistance in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus*×*Bos taurus*) cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24(7): 898-904.
- Lange NE, Zhou X, Lasky-Su J, Himes BE, Lazarus R, Soto-Quiro’s M, Avila L, Celedon JC, Hawrylowicz CM, Raby BA, Litonjua AA (2011). Comprehensive genetic assessment of a

- functional TLR9 promoter polymorphism: no replicable association with asthma or asthma-related phenotypes. *BMC Med Genet*, 12: 26.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5: 190-198.
- Maillard JC, Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Sidibe I, Stachurski F, Belemsaga D, Razafindraibe H, Elsen JM (2003). Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet Selec Evol*, 35 (Suppl. 1): S193-S200.
- Martínez R, Dunner S, Toro R, Tobón J, Gallego J, Cañón J (2010). Effect of polymorphisms in the *Slc11a1* coding region on resistance to brucellosis by macrophages *in vitro* and after challenge in two *Bos* breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and Molecular Biology*, 33(3): 463-470.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr (1997). Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-8.
- Menzies FD, Neill SD (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J*, 160(2): 92-106.
- Mucha R, Bhide MR, Chakurkar EB, Novak M, Mikula Sr I (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 128: 381-388.
- Omueti KO, Mazur DJ, Thompson KS, Lyle EA, Tapping RI (2007). The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *J Immunol* 178: 6387-6394.
- O'Reilly LM, Daborn CJ (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tuber Lung Dis*, 76: 1-46.
- Öcal N, Babür C, Yağcı BB, Macun HC, Çelebi Bi Kılıç S, Yağcı İP (2008). Kırıkkale yöresinde süt sığırlarında brusellozis, listeriozis ve toksoplazmozis'in seroprevalansı ve birlikte görülme sıklığı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 14: 75-81.
- Özbey G, Kalender H, Muz A (2008). Sığır tüberkülozu'nun epidemiyolojisi ve teşhisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22: 307-314.

- Paixao TA, Ferreira C, Borges AM, Oliveira DA, Lage AP, Santos RL (2006). Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1): 37-42.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 6: 91-99.
- Pehlivanoglu F, Öztürk D, Günlü S, Güldalı S, Türütoğlu, H. (2011). Prevalence of brucellosis in dairy herds with abortion problems. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (4): 615-620.
- Pereira F, Pereira L, Van Asch B, Bradley DG, Amorim A (2005). The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (*Capra hircus*) breeds: High diversity of female lineages at the western fringe of European distribution. *Molecular Ecology*, 14: 2313-2318
- Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wud R, Langaee TY, Rae DO (2009). Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 91: 189-196
- Prakash O, Kumar A, Sonwane A, Rathore R, Singh R V, Chauhan A, Kumar P, Renjith R, Yadav Ramji, Bhaladhare A, Baqir M, Sharma D (2014). Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle. *Mol Biol Rep*, 41: 2815-2825.
- Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler M, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*, 6: 946-959.
- Reddacliff LA, Beh K, McGregor H, Whittington RJ (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 83: 435-441.
- Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P (2000). Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J Clin Immunol*, 20: 161-166.
- Ronaghy A, Prakken BJ, Takabayashi K, Firestein GS, Boyle D, Zvaifler NJ, Roord ST, Albani S, Carson DA, Raz E (2002). Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol*, 168: 51-56.

- Roura-Mir C, Wang L, Cheng TY, Matsunaga I, Dascher CC, Peng SL, Fenton MJ, Kirschning C, Moody DB (2005). *Mycobacterium tuberculosis* regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J Immunol*, 175: 1758-1766.
- Russell CD, Widdison S, Leigh JA, Coffey TJ (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Veterinary Research*, 43: 17.
- Schwartz DA (2002). The genetics of innate immunity. *Chest*, 121: 62S-68S.
- Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA (2006). Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *J Dairy Sci*, 89: 3626-3635.
- Shtrichman R, Samuel CE (2001). The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol*, 4: 251-259.
- Sun L, Song Y, Riaz Hasan, Yang H, Hua G, Guo A, Yang L (2012). Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 147: 195- 201.
- Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S (2008). Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40: 281-286.
- Şahin O (2015). Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği, Simental ırkı yetiştiriciliğinde mevcut durum. Erişim Adresi: <http://www.dsymb.org.tr/wp-content/uploads/2016/02/Dr.ONUR-%C5%9EAH%C4%B0N.pdf>. Erişim Tarihi: 08.09.2017
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003). Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*, 21: 335-376.
- Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihara K, Kimoto Y et al (2007). Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis* 66: 905-909.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2017). Hayvancılık İstatistikleri. Erişim Adresi: <http://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>. Erişim Tarihi: 08.09.2017.
- Uciechowski P, Imhoff H, Lange C, Meyer CG, Browne EN, Kirsten DK, Schröder AK, Schaaf B, Al-Lahham A, Reinert RR, Reiling N, Haase H, Hatzmann A, Fleischer D, Heussen N, Kleines M, Rink L (2011). Susceptibility to tuberculosis is associated with

- TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 90: 377-388.
- Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEw, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Portaels F, Top J, Schouls LM, Van Embden JDA (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4): 1236-1245.
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 73(3): 469-485.
- Wang T, Lafuse WP, Takeda K, Akira S, Zwillin BS (2002). Rapid chromatin remodeling of toll-like receptor 2 promoter during infection of macrophages with *Mycobacterium avium*. *J Immunol*, 169: 795-801.
- West AP, Koblansky AA, Ghosh S (2006). Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 409-437.
- Wyllie S, Seu JA, Goss P (2002). The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect*, 4: 351-359.