

بررسی ارتباط ناحیه راه انداز ژن *TLR4* و تعداد سلول های سوماتیک در یک جمعیت گاو هلشتاین در استان اصفهان

Association of promoter region of *TLR4* gene with somatic cell count in a Holstein dairy herd in Isfahan province

آزاده خسروی^۱، سید ضیاء الدین میرحسینی^{۲*}، مصطفی محقق^۳

۱- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه گیلان

۳- استادیار دانشگاه یاسوج

Khosravi A¹, Mirhoseini SZ^{*2}, Mohaghegh M³

1,2. MSc Student and Associate Professor, Guilan University

3. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Yasouj University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

چکیده

ورم پستان یکی از شایع ترین بیماری ها در گاوهای شیری است. برای ایجاد مقاومت ژنتیکی نسبت به این بیماری، شناسایی ژن ها و آلل های مقاوم به ورم پستان ضروری است. گیرنده های شبه تول (TLRs) از ژن های کاندیدای مناسب برای افزایش مقاومت ژنتیکی به ورم پستان در گاوهای هلشتاین هستند. در این پژوهش چند شکلی راه-انداز ژن *TLR4* و ارتباط آن با تعداد سلول های سوماتیک در یک جمعیت از گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، از ۱۰۰ گاو هلشتاین نمونه خون تهیه و DNA آنها استخراج شد. برای راه-انداز ژن *TLR4* یک جفت آغازگر طراحی شد. این آغازگرها قطعه ای به طول ۲۷۴ جفت باز را در فرایند واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر نمودند. دو الگوی ژنتیکی A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۲۴ و ۰/۷۶ تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد که این الگوهای ژنتیکی اثر معنی داری بر تعداد سلول های سوماتیک در گاوهای هلشتاین جمعیت مورد بررسی دارد ($P < 0.01$). با توجه به پایین بودن توارث پذیری تعداد سلول های سوماتیک (۰/۰۹۳) و عدم کارایی انتخاب مستقیم برای بهبود صفت، انتخاب بر مبنای الگوهای ژنتیکی ژن *TLR4* می تواند برای بهبود مقاومت ژنتیکی در برابر ورم پستان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی

ژنوتیپ،
گاوهای هلشتاین،
ناحیه راه انداز،
ورم پستان،
TLR4

مقدمه

با بهبود ژنتیکی گاوهای شیری، تولید شیر افزایش یافته و افزایش تولید موجب حساسیت دام به برخی بیماری‌ها نظیر ورم پستان شده است. ورم پستان، یک بیماری تورمی غدد پستانی است که به وسیله عفونت داخل پستان ایجاد می‌شود. این بیماری به وسیله طیف وسیعی از پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی به وجود می‌آید که سبب فعال شدن سیستم ایمنی و دفاعی در پستان و افزایش سلول‌های سوماتیک در شیر می‌شود (Goldammer et al. 2004). کاهش تولید و کیفیت شیر از اثرات سوء این بیماری است. در ایران کاهش تولید ناشی از ورم پستان در سال ۱۳۸۵ معادل ۱۵۰ هزار تن برآورد شده است (Kasravi 2008). این مقدار بدون در نظر گرفتن خسارات فراوان ورم پستان بالینی نظیر کاهش عملکرد تولید مثل، کاهش ماده خشک و ترکیبات مطلوب در شیر (پروتئین، چربی، قند، پتاسیم و غیره)، افزایش ترکیبات نامطلوب در شیر (سدیم، کلر، آنزیم‌ها و غیره) و کاهش زمان ماندگاری شیر است (Kasravi 2008). افزایش مقاومت ژنتیکی به این بیماری، که پرهزینه‌ترین بیماری در پرورش گاو شیری است، می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد (Sordillo and Streicher 2008). از ژن‌های کاندیدا در زمینه مقاومت ژنتیکی می‌توان ژن‌های *TLR*^۱ (گیرنده‌های شبه تول) را نام برد که خانواده‌هایی از گیرنده‌های سلولی را کد می‌کند (Sharma et al. 2006). تاکنون ۱۳ نوع ژن *TLR* در پستانداران شناسایی شده است. این گیرنده‌ها توالی مولکولی خاصی از عوامل بیماری‌زا (PAMP)^۲ را تشخیص می‌دهند و در آغاز پاسخ‌های ایمنی بدن به پاتوژن‌های میکروبی نقش محوری دارند (Sabroe et al. 2003). ژن *TLR4* در بین گونه‌های گاو چندشکلی نشان می‌دهد و بروز آن در برخی نژادهای تجاری با ارزش ارثی، تداوم شیردهی و تعداد سلول‌های بدنی ارتباط دارند (Sharma et al. 2006). در بررسی‌های انجام شده در گاوهای سانهی (Sanhe) و سیمنتال و هلشتاین چینی مشخص شد که چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) موجود در اینترون یک و اگزون ۳ ژن *TLR4* با تعداد سلول‌های سوماتیکی در شیر در ارتباط است (Wang et al. 2007).

تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در اینترون یک، اگزون ۳ و ناحیه 5'UTR این ژن با تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر در گاوهای هلشتاین برزیلی در ارتباط است (Mesquita et al. 2012). همچنین چند شکلی‌های شناسایی شده در اگزون شماره ۳ این ژن در گاوهای ساهیوال هند با ورم پستان مرتبط هستند، به طوری که برخی ژنوتیپ‌ها به این بیماری مقاوم‌تر می‌باشند (Wakchaure et al. 2012). در گاوهای Murrah هندوستان نیز SNP شناسایی شده در اگزون ۳ ژن *TLR4* موجب شده است تا ژنوتیپ‌های aa نسبت به ab ورم پستان مقاوم‌تر باشند (Gulhane and Sangwan 2012).

هدف از این مطالعه یافتن ارتباط بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه راه انداز ژن *TLR4* و بیماری ورم پستان و شناسایی ال‌های مرتبط با مقاومت به ورم پستان در گاوهای هلشتاین جمعیت مورد نظر است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این پژوهش از نمونه‌های خون ۱۰۰ گاو هلشتاین شرکت کشت و دام قیام وابسته به بنیاد مستضعفان و جانبازان استان اصفهان استفاده شد. اطلاعات مربوط به رکوردهای انفرادی تعداد سلول‌های سوماتیک در دوره‌های مختلف شیردهی و همچنین مشخصات شجره‌ای دام‌ها شامل شماره ثبت والدین و حیوان و سال و فصل زایش اخذ و برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA

با استفاده از کیت دیاتوم از خون هموژن DNA استخراج شد. کیفیت DNA به دست آمده با استفاده الکتروفورز یا ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد و غلظت آن با دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد.

PCR

برای تکثیر ناحیه راه انداز ژن *TLR4* به طول ۲۷۴ جفت باز، از یک جفت آغاز گر استفاده شد. این آغازگرها با استفاده از نرم

^۱ Toll-Like receptor^۲ Pathogen-associated molecular patterns

افزار 3 Primer و با استفاده از توالی بانک ژن به شماره DQ839567.1 طراحی شد. توالی آغازگر مورد استفاده به شرح زیر بود:

5'-TGGCTGGAACATAGGAAATG-3'
5'-GGTTACGGGAGGAGAGGAAG-3'

واکنش زنجیره ای پلیمراز به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و ۳۵ چرخه و با استفاده از یک جفت آغازگر و با ترکیب دو میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۲۵۰ میکرومولار dNTPs، ۵۰ نانو گرم DNA، آغازگرهای رفت و برگشت هر کدام ۱۰ پیکو مول و بافر واکنش یک برابر انجام شد. برنامه حرارتی شامل دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشته سازی ثانویه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۷ دقیقه بود. برای این منظور از دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO-RAD استفاده شد.

برای تعیین اندازه قطعه به دست آمده از مرحله تکثیر، ۸ میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و با نشانگر وزنی M100 با ولتاژ ۹۵ ولت و به مدت یک ساعت بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز انجام شد.

الکتروفورز

با توجه به اندازه آلل‌ها و قدرت تفکیک ژل‌های مختلف، پلی اکریل آمید ۸ درصد برای تفکیک الل‌های مورد نظر به کار برده شد. در این تحقیق از تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد SSCP^۱ برای تشخیص چند شکلی ژنتیکی در این جایگاه ژنی استفاده شد. در این روش تفاوت‌های موجود در تک نوکلئوتیدها موجب تفاوت در فرم فضایی ساختار نوع سوم DNA تک رشته‌ای می شود. برای تک رشته‌ای کردن محصولات PCR قبل از انجام الکتروفورز، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۹ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از مخلوط مورد نظر در چاهک‌ها بارگذاری شد. تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی رابطه بین ژنوتیپ‌ها و تعداد سلول‌های سوماتیک در ابتدا ارزش اصلاحی دام‌ها برای تعداد سلول‌های سوماتیک با استفاده از نرم افزار Wombat ویرایش ۱/۱ برآورد شد. محاسبه وراثت‌پذیری نیز با استفاده از نرم افزار Wombat نسخه ۱،۱ انجام شد که از الگوریتم میانگین اطلاعات حداکثر درستی محدود شده REML (AI)^۲ استفاده میکند. برازش داده‌ها در SAS ویرایش ۹،۱ و با استفاده از اثرات ثابت سال- فصل و دوره شیردهی طبق مدل زیر انجام شد:

$$Y = Zu + Xb + e$$

در این مدل Y بردار مشاهدات؛ b بردار اثر عوامل ثابت موثر برصفت شامل سال- فصل و دوره شیردهی؛ u بردار اثر تصادفی ژنتیک افزایشی؛ Z و X ماتریس‌های مدل و e بردار اثرات تصادفی باقی‌مانده هستند.

برای بررسی رابطه بین تعداد سلول‌های سوماتیک و الگوهای ژنتیکی از مدل رگرسیون لجستیک استفاده شد.

$$\text{Logit}(\pi) = \log[\pi / (1 - \pi)] = \beta_0 + \beta_1 x_i$$

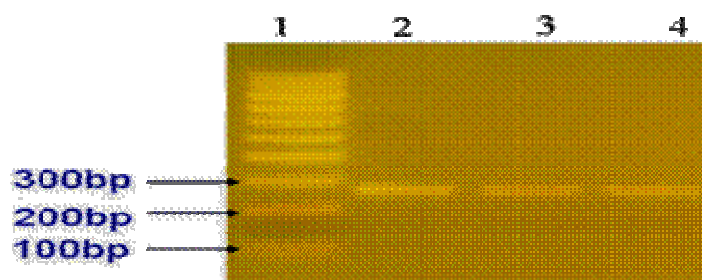
در این مدل β_0 عرض از مبدا؛ β_1 شیب خط و x_i متغیر مستقل پیوسته (سلول سوماتیک) هستند.

نتایج و بحث

نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز، صحت قطعه ۲۷۴ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه راه-انداز ژن *TLR4* گاوهای هلشتاین را توسط نشانگر اندازه مورد تایید قرار داد (شکل ۱). نتایج حاصل از الکتروفورز ژل اکریلامید برای گاوهای هلشتاین مشخص کرد که ناحیه راه‌انداز ژن *TLR4* در گاوهای هلشتاین حالت چندشکلی از خود نشان می‌دهد که منجر به شناسایی الگوی ژنتیکی A و B (شکل ۲) با فراوانی ۰/۷۴ و ۰/۲۶ در این گاوها شده است. براساس نتایج ارائه شده، مقدار آماره کای اسکوار ($\chi^2 = 13.811$) معنی‌دار شده است ($P < 0.01$) بنابراین در مدل رگرسیونی لجستیک برازش یافته، تنها حضور متغیر وضعیت الگوی ژنتیکی (A و B) مورد تایید قرار گرفت که دارای اثر معنی داری بر روی تعداد سلول‌های سوماتیک مشاهده شده (وقوع ورم پستان) است ($P < 0.01$).

² Average Information restricted maximum likelihood

¹ Single strand conformation polymorphism



شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز یک درصد. ستون اول از چپ مربوط به نشانگر اندازه و ستون های ۲-۴ نمونه های مربوط به گاوها هستند.



شکل ۲- باندهای ایجاد شده توسط آغازگر مورد استفاده روی ژل اکریلامید ۸ درصد. عدد ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به الگوهای ژنتیکی A و B هستند.

سوماتیک ($P < 0.01$)، درصد پروتئین و همچنین درصد چربی شیر ($P < 0.05$) مرتبط بود (Beecher et al. 2010).

در جمعیت گاوهای هلشتاین برزیلی سه لوکوس ژن *TLR4* (اینترون ۱، اگزون ۳ و ناحیه 5'UTR) مورد بررسی قرار گرفت و سه آلل A و B و C در این لوکوس‌ها مشاهده شد. گاوهای با ژنوتیپ AA در لوکوس یک و CC در لوکوس‌های ۲ و ۳ تعداد سلول‌های سوماتیکی کمتری ($P < 0.05$) در شیر خود داشتند (Mesquita et al. 2012). چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی SNPs لوکوس‌های اینترون یک و اگزون ۳ ژن *TLR4* گاوهای هلشتاین و سیمنتال و Sanhe در چین منجر به شناسایی دو آلل A و B در این جمعیت‌ها شد. بر اساس این گزارش تعداد سلول‌های سوماتیکی موجود در شیر با این چندشکلی مرتبط بوده و آلل A می‌تواند نقش مهمی در مقاومت ژنتیکی به ورم پستان ایفا نماید (Wang et al. 2007). در گاوهای ساهیوال هندوستان نیز با

براساس برآورد، پارامترهای β_0 و β_1 معنی‌دار بوده و مدل مربوطه به صورت زیر ارائه می‌شود:

$$\text{Logit}(\pi) = -0.005 + 1.686$$

نتایج مشابهی نیز در سایر نژادهای گاو گزارش شده است (Sharma et al. 2006; Wang et al. 2007; Beecher et al. 2010; Wakchaure et al. 2012; Mesquita et al. 2012). نتایج بررسی‌های Sharma et al. 2006 در گاوهای هلشتاین کانادا یک چندشکلی در ناحیه راه‌انداز (P-226) و دو چند شکلی در اگزون ۳ (E+1656 و E+2021) را گزارش کردند. در این تحقیق همچنین ارتباط تداوم شیردهی با ژنوتیپ‌های P-226 ($P < 0.004$) و E3+1656 ($P < 0.002$) و E3+2021 ($P < 0.003$) با ژنوتیپ E3+2021 ($P < 0.003$) مورد تایید واقع شده است.

در بررسی که در گاوهای هلشتاین فرزین ایرلندی صورت گرفت، چندشکلی موجود در ژن *TLR4*-2021 با تعداد سلول های

جدول ۱- برآورد پارامترهای β_0 و β_1 موجود در مدل لجستیک

(B) Exp	Sig	df	Wald	S.E.	B
0.995	0.003	1	8.770	0.002	سلول سوماتیک
5.397	0.000	1	28.740	0.314	مقدار ثابت

استفاده از روش PCR- RFLP و به کارگیری آنزیم محدودالایتر *HinfI* اگزون ۳ ژن *TLR4* مورد بررسی قرار گرفت. دو آلل C و D در این جایگاه مشخص شدند که ژنوتیپهای CC و DD نسبت به ورم پستان حساس تر بودند (Wakchaure et al. 2012). با توجه به تشابه عملکرد ژن *TLR4* در گونه های مختلف گاو، تفاوت تکنوکلوئیدی اگزون ۳ این ژن در گاومیش های Murrah هندوستان با استفاده از آنزیم محدودالایتر StyI و روش PCR- RFLP منجر به شناسایی دو آلل A و B شد. ژنوتیپ های AA نسبت به ورم پستان مقاوم تر ($P < 0.05$) از ژنوتیپ های AB بودند (Gulhane and Sangwan 2012).

جدول ۲ بیانگر الگوهای ژنتیکی و برآورد همبستگی های ژنتیکی (R_g) بین این الگوهای A و B و ارزش های اصلاحی و تعداد سلول های سوماتیک، واریانس باقیمانده (V_e) و واریانس ژنتیکی (V_g) تعداد سلول های سوماتیک و میزان احتمال معنی داری همبستگی های ژنتیکی (P) است. طبق اطلاعات به دست آمده از جدول ۲ تعداد سلول های سوماتیک در گاوهای شیری این تحقیق وراثت پذیری پایینی دارند ($h^2 = 0.093$). وراثت پذیری پایین سلول های سوماتیک بیانگر این مطلب است که این صفت بیشتر تحت تاثیر اثرات محیطی بوده و پیشرفت ژنتیکی آن کم است و انتخاب مستقیم برای این صفت نمی تواند کارگشا باشد. نتیجه مشابهی نیز در گاوهای شیری استرالیا گزارش شده است (Hill 1981). در آن تحقیق میانگین وراثت پذیری برآورد شده برای مدل رگرسیون تصادفی پدر و مدل رگرسیون تصادفی حیوان و مدل چند صفتی پدر در اولین دوره شیردهی به ترتیب ۰/۰۹، ۰/۰۹ و ۰/۰۸ و برای شکم دوم و سوم زایش ۰/۰۹ و ۰/۱۱ بود و این در حالی است که در پژوهش حاضر نیز وراثت پذیری برای سلول های سوماتیک ۰/۰۹۳ برآورد شده است.

بر اساس جدول ۲ همبستگی ژنتیکی بین الگوهای ژنتیکی و ارزش های اصلاحی ۰/۲۶۴ و همچنین همبستگی ژنتیکی بین الگوهای ژنتیکی و سلول های سوماتیک ۰/۲۲۴ برآورد شده است ($P < 0.03$) پایین بودن توارث پذیری صفت بیانگر این امر است که انتخاب مستقیم برای این صفت نمی تواند رشد ژنتیکی مناسبی را به همراه داشته باشد و به عبارتی تعداد سلول های سوماتیکی مشاهده شده برای هر گاو، معیار خوبی برای انتخاب گاوها نیست. از سوی دیگر میزان همبستگی مناسب تعداد سلول های سوماتیکی با الگوهای ژنتیکی مشاهده شده می تواند معیار مناسبی برای انتخاب گاوها بر مبنای ژنوتیپ آن ها ارایه نماید. Sharma et al. (2006) همبستگی ژنتیکی بین SCC و وقوع ورم پستان کلینیکی را بررسی، و اعلام کردند که همبستگی بین این دو صفت بالا است و از این رو چندشکلی در ژن *TLR4* و سلول های سوماتیک می توانند با هم ارتباط داشته باشند.

در حال حاضر با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری ورم پستان، تعداد سلول های سوماتیک (علیرغم پایین بودن توارث پذیری) به عنوان یک صفت در شاخص انتخاب گاوها برای مقاومت به ورم پستان استفاده می شود (Koivula et al. 2005). دلیل این امر این است که تعداد رکوردهایی که برای سلول های سوماتیک در هر دوره شیردهی ثبت می شود بالاست (جزء صفات تکرارشونده در زمان^۱ است)، علاوه بر دارا بودن همبستگی بالا با ورم پستان، وراثت پذیری بالاتری نسبت به ورم پستان دارد در نتیجه برآوردهای دقیق تری برای گاوهای مورد آزمون نتایج^۲ می دهد. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی می تواند کارایی پایین انتخاب مستقیم برای این صفت را جبران نماید.

¹ Longitudinal data² Progeny test

جدول ۲- الگوهای ژنتیکی و برآورد همبستگی های ژنتیکی آنها با ارزش های اصلاحی و تعداد سلول های سوماتیک و همچنین واریانس ژنتیکی تعداد سلول های سوماتیک

ژنوتیپ های <i>TLR4</i>	میانگین SCC	h^2	R_g BV of patern	R SCC of patern	V_r SCC	V_g SCC	P
الگوی A	۶۲/۳ ^a	۰/۲۶۴	۰/۲۲۴	۷۹۹۱	۸۱۵/۸۵	۰/۰۰۸۸	
الگوی B	۱۰۹/۳ ^b						
SCC	۰/۰۹۳						

^{a, b} نمادهای متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن است ($P < 0.03$).

SCC (تعداد سلول های سوماتیک؛ h^2) وراثت پذیری تعداد سلول های سوماتیک؛ R_g BV of pattern) همبستگی ژنتیکی سلول های سوماتیک با الگوی ژنتیکی؛ R (SCC of pattern) همبستگی تعداد سلول های سوماتیک با الگوی ژنتیکی؛ V_r SCC واریانس باقیمانده تعداد سلول های سوماتیک و V_g SCC واریانس ژنتیکی تعداد سلول های سوماتیک.

گاوهای نر برتر و پایین آوردن تعداد سلول های سوماتیک استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت کشت و دام قیام وابسته به بنیاد مستضعفان و جانبازان استان اصفهان و همچنین آقایان دکتر شادپور، مهندس چگینی، مهندس لعالیون و مهندس اسدیان به خاطر همکاری های موثر کمال سپاسگزاری و تشکر را دارند.

ارتباط چندشکلی ژن *TLR4* با SCC ممکن است به همبستگی ژنتیکی بالای بین SCC و وقوع ورم پستان بالینی نسبت داده شود (Shook and Schutz 1993) لذا به دلیل بالا بودن همبستگی ژنتیکی بین SCC و وقوع ورم پستان، می توان از این الگوهای ژنتیکی در تشکیل یک شاخص انتخاب به همراه صفات تولیدی و اقتصادی دیگر (نظیر تولید شیر و صفات تولیدمثل) جهت انتخاب

منابع

Beecher C, Daly M, Childs S, Berry DP, Magee DA, McCarthy TV, Giblin L (2010) Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. BMC Genetics 11:99.

Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM (2004) Mastitis increases mammary mRNA abundance of β - defensin 5, Toll-like receptor 2 (TLR2) and *TLR4* but not TLR9 in cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 11:174-185.

Gulhane AB, Sangwan ML (2012) Polymorphism in *TLR4* gene and its association with mastitis in Murrah buffaloes. Indian Journal Biotechnology 11:330-332.

Hill AW (1981) Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow Research in veterinary science 31:107-112.

Kasravi R (2008) Trouble shooting contagious mastitis in dairy herds. Proceedings of 15th Iranian Veterinary International Convention. Tehran, Iran. 33-37. (In Farsi).

Koivula M, Mantysaari EA, Negussie E, Serenius T (2005) Genetic and phenotypic relationship among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. Journal Dairy Science 88:827-833.

Mesquita AQ, Rezende CSM, de Mesquita AJ, da Veiga Jardim EAG, Kipnis APJ (2012) Association of *TLR4* polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian Holstein. Brazilian Journal Microbiology 43:

Sabroe I, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH, Vogel SN, Dower S (2003) Toll- like receptors in health and disease: Complex questions remain. Journal Immunology 171:1630-1635.

Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA (2006) Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. Journal Dairy Science 89:3626-3636.

Shook GE, Schutz MM (1993) Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. Journal Dairy Science 77: 648-658.

Sordillo LM, Streicher KL (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Journal Mammary Gland Biology 7:135-146.

Wakchaure RS, Gupta ID, Verma A, Kumar D, Rajesh Kumar S, Soumya NP (2012) Genetic polymorphism in *TLR4* and its association with incidences of mastitis in Sahiwal cattle. Wayamba Journal Animal Science 4: 291-295.

Wang X, Xu S, Goa X, Ren H, Chen J (2007) Genetic polymorphism of *TLR4* gene and correlation with mastitis in cattle. Journal of Genetics and Genomics 34: 406-412.