

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta

## DISERTAČNÍ PRÁCE

2015

Ing. Libor Večerek

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu**

Ing. Libor Večerek

**2015**

**Školitel:**

prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

### **Poděkování:**

Rád bych poděkoval vedoucímu disertační práce prof. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc., za odbornou pomoc, kterou mi poskytoval v průběhu doktorandského studia. Rovněž bych chtěl poděkovat spolupracovníkům z laboratoře genetiky a molekulární biologie katedry, kteří spolupracovali na genotypizacích vzorků.

Poděkování patří i mé rodině za trpělivost a shovívavost v období doktorandského studia.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 30.6.2015

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. ÚVOD	4
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
2.1 Genom	6
2.2 Definice pojmu genetická choroba, hlediska klasifikace	6
2.2.1 Monogenní choroby	7
2.2.1.1 Vyhodnocení frekvencí	8
2.2.2 Chromozomální aberace	9
2.3 Kongenitální vady	12
2.4 Přehled vybraných dědičných poruch zdraví skotu	13
2.4.1 Deficit adheze leukocytů skotu	13
2.4.2 Komplex vertebrálních malformací	16
2.4.3 Citrulinémie skotu - deficit aktivity kyselé argininosukcinátsyntetázy	19
2.4.4 Deficit uridin-5' - monofosfát syntázy	20
2.4.5 Deficit kyselé maltázy - generalizovaná glykogenóza	21
2.4.6 Glykogenóza V	25
2.4.7 Deficit krevního koagulačního faktoru XI	26
2.4.8 Arachnomelie - „syndrom pavoučích nohou“	28
2.4.9 Syndaktylie	32
2.4.10 Chediak–Higashi syndrom	34
2.4.11 Leucinóza - nemoc javorového sirupu	37
2.4.12 Protoporfyrie	39
2.4.13 $\alpha$ – manosidóza	41
2.4.14 $\beta$ – manosidóza	43
2.5 Vybrané metody využívané pro genotypizaci sledovaných lokusů	45
2.5.1 PCR polymerase chain reaction	45
2.5.2 PCR-RFLP	45
2.5.3 AS-PCR	46
2.5.4 PCR-PIRA	47
3. CÍLE PRÁCE	47

3.1	Genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v České republice .....	47
3.2	Molekulárně genetická analýza DNA v lokusu <i>ITGB2</i> skotu.....	48
4.	MATERIÁL A METODIKA .....	48
4.1	Analýza výskytu vybraných monogenních defektů .....	48
4.1.1	Zvířata .....	48
4.1.1.1	Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na BLAD, DUMPS, citrulinémii .....	49
4.1.1.2	Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na CVM .....	50
4.1.1.3	Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na GSD V a GSD II .....	50
4.1.1.4	Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na deficit krevního koagulačního faktoru XI.....	50
4.1.2	Izolace DNA .....	50
4.1.2.1	Izolace DNA z periferní krve (standardní postup).....	51
4.1.2.2	Izolace DNA z periferní krve (lyzátoová metoda) .....	51
4.1.2.3	Izolace DNA ze spermatu .....	52
4.1.3	Genotypizace .....	52
4.1.3.1	Genotypizace lokusů na BLAD, DUMPS, citrulinémii .....	53
4.1.3.2	Genotypizace lokusu na CVM .....	55
4.1.3.3	Genotypizace lokusů na GSD II a GSD V .....	60
4.1.3.4	Genotypizace lokusů na deficit krevního koagulačního faktoru XI .....	64
4.2	Restrikční analýza části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) .....	66
4.2.1	Restrikční analýza části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) u deseti holštýnských krav se statusem TL .....	66
4.2.2	Restrikční analýza části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) u pěti holštýnských krav se statusem BL, včetně dvou kontrolních zvířat se statusem TL.....	70
4.2.3	Detekce tiché bodové mutace c.775C>T v lokusu <i>CD18</i> skotu holštýnského plemene, zvířat se statusem TL nebo BL a u českého strakatého skotu, metodou PCR-RFLP .....	71
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	73
5.1	Analýza výskytu vybraných monogenních defektů a diskuse .....	73
5.1.1	BLAD .....	73
5.1.2	DUMPS .....	76
5.1.3	Citrulinémie .....	77

5.1.4	CVM .....	78
5.1.5	GSD V .....	81
5.1.6	GSD II .....	83
5.1.7	Deficience krevního koagulačního faktoru XI .....	84
5.2	Výsledky restrikční analýzy části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) ..	86
5.2.1	Vyhodnocení výsledků restrikční analýzy části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) u holštýnských krav se statusem TL .....	86
5.2.2	Vyhodnocení výsledků restrikční analýzy části lokusu <i>ITGB2</i> ( <i>CD18</i> ) u holštýnských krav se statusem BL včetně srovnání s výsledky zkoumaných zvířat se statusem TL .....	91
5.2.3	Výsledky detekce tiché bodové mutace c.775C>T v lokusu <i>CD18</i> skotu holštýnského plemene, zvířat se statusem TL nebo BL a u českého strakatého skotu, metodou PCR-RFLP .....	97
6.	ZÁVĚR .....	102
6.1	Genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v České republice .....	102
6.2	Molekulárně genetická analýza DNA v lokusu <i>ITGB2</i> skotu .....	105
6.3	Doporučení pro praxi .....	106
7.	SOUHRN .....	110
7.1	Summary .....	114
8.	PŘEHLED LITERATURY .....	119
8.1	Přehled použité literatury .....	119
8.2	Seznam literatury s již publikovanými výsledky .....	147
9.	PŘÍLOHY.....	148



## Seznam použitých zkratek

- AIRS – artificial introduction of restriction sites
- ALA – aminolevulová kyselina
- AMP – adenosinmonofosfát
- AS – arachnomelia syndrome
- AS-PCR – allele specific polymerase chain reaction
- ASS – gen skotu: argininosuccinate synthetase 1
- ATP – adenosintrifosfát
- BCAA – branched chain amino acids
- BCKA – branched chain  $\alpha$  - keto acid
- BCKDHA* – gen skotu: branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
- BCKDHB* – gen skotu: branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
- BL – mezinárodní kód pro heterozygotní jedince s alelou pro BLAD
- BLAD – bovine leukocyte adhesion deficiency
- bp – báze páry
- CD11/CD18 – podjednotky  $\beta 2$  heterodimerického integrinu
- cDNA – complementary DNA
- CLAD – canine leukocyte adhesion deficiency
- CNS – centrální nervová soustava
- CRV – CRV Czech Republic, spol. s r.o.
- CV – mezinárodní kód pro heterozygotní jedince s alelou pro CVM
- CVM – complex vertebral malformation
- ČMSCH, a.s. – Českomoravská společnost chovatelů, a.s.
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- dNTP's – deoxynucleotide triphosphates
- DP – mezinárodní kód pro heterozygotní jedince s alelou pro DUMPS
- DUMPS – deficiency of uridine monophosphate synthase
- EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová
- EHRC – European Holstein and Redholstein Confederation
- ELFO – elektroforetická separace v agarózovém gelu
- FBN – Leibniz-Institut für Nutztierbiologie
- F11* – gen skotu: coagulation factor XI

FAO – Food and Agriculture Organization  
FC – ferochelatóza  
*FECH* – gen skotu: ferrochelátase  
*GAA* – gen slotu: acid alpha glucosidase  
GSD II – glycogen storage disease II  
GSD V – glycogen storage disease V  
CHS – Chediak– Higashi syndrom  
ID – Inseminační dávka  
ISB – inseminační stanice býků  
*ITGB2* – gen skotu: integrin  $\beta$ 2  
KDZ – kontrola dědičnosti zdraví  
LAD – leukocyte adhesion deficiency  
LDL – low density receptor  
*LRP4* – gen skotu: low density lipoprotein receptor- related protein 4  
LYST – cytosolový protein  
*MAN2B1* – gen skotu: mannosidase, alpha, class 2B, member 1  
*MANBA* – gen skotu: mannosidase beta A, lysosomal precursor  
MFD – mule foot disease  
*MOCSI* – gen skotu: molybdenum cofactor synthesis 1  
MSUD – maple syrup urine disease  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals  
PCR – polymerase chain reaction  
PH – plemeno hereford bezrohý  
PK – proteináza K  
PP – protoporphyria  
PS – plemeno shorthorn bezrohý  
*PYGM* – gen skotu: phosphorylase glycogen muscle  
RE – restriční endonukleázy II. třídy  
RFLP – restriction fragment length polymorphism  
RNA – ribonukleová kyselina  
SAA – arachnomelia and arthrogryposis  
SDS – dodecylsulfát sodný  
SCHHS ČR – Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o.s.

*SLC35A3* – gen skotu: solute carrier family 35 member 3  
*SUOX* – gen skotu: sulfite oxidase  
SVÚ – Státní veterinární ústav  
SY – syndactyly  
TD – mezinárodní kód pro zdravé jedince bez alely pro DUMPS  
TE – pufr (Tris-HCl + EDTA)  
TL – mezinárodní kód pro zdravé jedince bez alely pro BLAD  
TM – alela pro tichou mutaci  
Tris-HCl – tris-hydroxymethyl-aminomethanu hydrochlorid  
TV – mezinárodní kód pro zdravé jedince bez alely pro CVM  
UMPS – enzym uridin-5' - monofosfát syntáza  
UV – ultrafialové záření  
VÚVeL – Výzkumný ústav veterinárního lékařství  
WHFF – World Holstein Friesian Federation

# 1. Úvod

Chov skotu – tura domácího (*Bos primigenius f. taurus*) má pro lidstvo nezastupitelný význam jako součást zemědělského hospodaření, pro produkci potravin, surovin, úrodnost půdy, utváření krajiny, v některých oblastech jako pracovní i dopravní prostředek, může být kulturním nebo i náboženským symbolem.

Podle statistik FAO (FAOSTAT, 2011) je na světě chováno cca 1,4 miliard kusů skotu. SAMBRAUS (2006) uvádí existenci cca 450 plemen. Nejvyšší stavy skotu mají Indie, Brazílie, Čína, USA, EU, Etiopie.

Základem úspěšného chovu je zdravá populace zvířat, kdy člověk i vzhledem ke svému zdraví má povinnost pečovat o zdraví chovaných zvířat, neboť jen geneticky kvalitní plemena a konstitučně zdatní jedinci zajistí požadavky, které jsou na ně člověkem kladeny. V současné době jsou tyto nároky zejména v hospodářsky rozvinutých zemích, ve srovnání se situací např. na počátku 20. století, diametrálně odlišné.

U ušlechtilých plemen skotu, která byla vyšlechtěna v relativně nedávné době, můžeme pozorovat nejen stále rostoucí úroveň užitekosti, která již dnes je mnohdy na hranici fyziologické únosnosti, zejména u mléčného skotu, ale i postupné oslabování tělesné konstituce chovaných jedinců. Zároveň u těchto plemen se zvyšují nároky na chovatelské podmínky. Dalším nezanedbatelným problémem je u některých plemen nárůst intenzity příbuzenské plemenitby, typickým příkladem je holštýnský skot.

Může se zdát, že geneticky podmíněná a dědičně přenosná onemocnění skotu nepatří mezi největší veterinární problémy, do jisté míry tomu tak mohlo být před nástupem moderních reprodukčních metod. Pokud byla využívána pouze přirozená plemenitba, na rozdíl od nyní, zejména u dojných plemen, téměř výhradně uplatňované umělé inseminace, docházelo k pomalému šíření těchto genetických onemocnění, nově vzniklá onemocnění např. u plemeníků byla předávána jen malému počtu potomků a v omezené oblasti. Případné skryté postižení, vyskytující se u plemeníků, nemělo tak závažný rozsah s ekonomickým dopadem jako dnes.

V současnosti, kdy se zemědělství stalo součástí globalizovaného tržního a ekonomického systému, nabývají i tyto, dříve spíše okrajové, zdravotní problémy, zejména u skotu na svém významu. Závažnost a rozsah tohoto problému souvisí se šlechtěním skotu, používáním omezeného počtu mezinárodně uznávaných plemeníků, s rozvojem umělé inseminace a s celosvětovým obchodem s plemenným materiálem.

Mezinárodní plemenářské organizace, např. Interbull, preferují plemenná zvířata, především elitní plemenné býky, kteří jsou výraznými zlepšovатели často specifických užitkových a exteriérových vlastností. Sperma těchto několika desítek elitních plemeníků je intenzivně celosvětově využíváno při umělé inseminaci. Pokud se např. takové heterozygotní zvíře ve sledovaném genu stane skrytým nositelem recesivního dědičného onemocnění, zvyšuje se riziko celosvětového šíření onemocnění v chovech skotu.

Již klasickým příkladem této situace je v mléčné užitkovosti vynikající americký holštýnský plemenný býk Carlin-M Ivanhoe Bell, narozený v r. 1974, který se stal hlavním šířitelem dvou recesivně dědičných letálních onemocnění BLAD a CVM, které sám zdědil po svých předcích. Bell měl prostřednictvím inseminace stovky synů plemeníků a desetitisíce dcer, kteří byli nositeli vynikajících užitkových vlastností, ale i skrytými heterozygotními šířiteli těchto dědičných onemocnění v chovech po celém světě. Choroby se začaly projevovat až v dalších generacích, po několika desetiletích, kdy došlo k připarování vzdálených samčích heterozygotních potomků Bella na jeho heterozygotní vzdálené potomky samičí. Díky tomu vznikly relativně nezanedbatelné ekonomické ztráty.

Přestože například výskyt letálních recesivně dědičných chorob je většinou sporadický, je nutné mít k dispozici programy, které by zamezovaly šíření těchto chorob.

S rozvojem metod molekulární biologie lze již spolehlivě identifikovat tato dědičná onemocnění, včetně jejich přenosu a odhalování skrytých heterozygotních nositelů. Ve světě i v České republice jsou uplatňovány programy zabývající se touto problematikou.

V chovatelsky vyspělých zemích se kontrole genetického zdraví věnuje velká pozornost. V České republice podle plemenářského zákona (zákon č. 154/2000 Sb. Sb.) provádí kontrolu zdraví a kontrolu dědičnosti zdraví vyjmenovaných zvířat orgány státní správy. Pro kontrolu dědičnosti zdraví je to v současnosti Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Genom

Genetická informace, neboli genom, se přenáší v zakódované formě v podobě sekvence bází v DNA. Převážná většina této informace je přítomna v jádře, tj. v chromozómech, avšak malý podíl nacházíme v cytoplazmě, konkrétně mitochondriích, z nichž každá obsahuje neobalenou cirkulární molekulu DNA (PRITCHARD and KORF, 2003).

Termínem genom se označuje soubor všech genů jedince. Můžeme rozlišovat složitý jaderný genom a jednoduchý mitochondriální genom (SRŠEŇ and SRŠŇOVÁ, 2005). Genotyp – dvojice alel současně přítomných na daném lokusu obou homologických chromozómů. V souvislosti s pozorovatelným projevem (expresivitou) určitého genu se používá termín fenotyp daného genu, což platí i pro expresivitu většího počtu specifických genů, rep. celého genomu (SRŠEŇ and SRŠŇOVÁ, 2005). Genomy jednotlivců i v rámci plemene vykazují určitou míru rozdílnosti, míra rozdílnosti klesá u příbuzných jedinců.

Skot (*Bos primigenius* f. *taurus*) je diploidní eukaryontní organismus. Po přečtení genomu skotu (plemeno hereford) r. 2009, byla zjištěna velikost bovinního genomu 2 857 605 192 bp, z nichž 2 612 820 649 bp je umístěno ve 30 chromozómech. Zbývajících 245 Mbp je obsaženo v neumístěných souvislých sekvencích (kontizích) (ZIMIN et al., 2009). Informace o genomu skotu jsou stále upřesňovány, k I. pololetí 2015 bylo v jaderné a mitochondriální DNA identifikováno přibližně 26410 genů a 10047 pseudogenů (NCBI, 2015).

### 2.2 Definice pojmu genetická choroba, hlediska klasifikace

Genetická choroba je v podstatě každá nemoc, která byla adekvátně studována, je častější u příbuzných postiženého jedince než v obecné populaci (HATINA and SYKES, 1999).

U genetických poruch zdraví dochází k fyziologickým anomáliím v postiženém organismu v porovnání s normálním stavem (STÖPPLER, 2014).

Genetická informace není neměnná, za určitých podmínek může dojít k její změně neboli mutaci. Mutace se vyskytují buď náhodně, nebo působením životního prostředí. Mutace

DNA je primární podstatou vzniku geneticky podmíněných patologických stavů, která se přenáší na další generace buněk vznikajících z původní mateřské buňky postižené mutací.

Geneticky patologický stav označuje všechny chorobné stavy s mutací genetické informace různého druhu, rozsahu a lokalizace. Ne všechny však mají dědičný charakter (například většina chromozómových aberací). Dědičné nemoci jsou užším pojmem a jejich základní vlastností je přenos mutantní DNA, a tím i onemocnění z generace rodičů na generaci potomků. Jejich podstatou je skutečnost, že mutantní genetická informace se nachází nejen v somatických buňkách, ale i v pohlavních buňkách, a jejich prostřednictvím se přenáší na potomstvo (SRŠEŇ and SRŠŇOVÁ, 2005).

Genetické onemocnění je porucha způsobená abnormalitami v individuálním genomu. Abnormalita se může pohybovat od nepatrné, až po významnou, od diskrétní mutace v jedné bázi nukleotidu v DNA jednoho genu, až k velkým chromozómním abnormalitám zahrnujícím zvýšení nebo snížení počtu jednotlivých chromozómů, nebo sad chromozómů (STÖPPLER, 2014).

Genetická onemocnění jsou tradičně dělena do tří hlavních kategorií: monogenní, chromozómní a multifaktoriální (PRITCHARD and KORF, 2003).

### **2.2.1 Monogenní choroby**

Většina monogenních poruch se projeví po porodu, ovlivňuje rovněž časnou morbiditu a mortalitu. Multifaktoriální onemocnění se projeví zejména ve vyšších věkových kategoriích. Monogenní poruchy mohou mít autozomálně dominantní dědičnost, autozomálně recesivní dědičnost, neúplnou dominanci (genová exprese u heterozygotů je intermediární mezi genovou expresí obou homozygotů), v některých případech ani jedna z alternativních alel není dominantní, tento stav se nazývá kodominance. Dále může jít o X-vázanou recesivní dědičnost, X-vázanou dominantní dědičnost (PRITCHARD and KORF, 2003).

Genetické poruchy postihující plemena skotu jsou poměrně časté a mohou být ekonomicky závažné zejména v populacích na národní i mezinárodní úrovni (JOLLY, 2002). Vyskytují se u všech plemen skotu, avšak některé vady mají silnou vazbu na určitá plemena. Genetická onemocnění mléčných a masných plemen skotu jsou tkáňově specifická: kosterní, CNS, krve, kůže, svalů, očí atd. Genetické abnormality přispívají ke špatné výkonnosti zvířat, nemocnosti, mohou mít semiletální a letální charakter atd. (GHOLAP et al., 2014). Katalog

OMIA (2014) – online Mendelian inheritance in animals uvádí k říjnu 2014 u skotu celkem 455 typů postižení.

Mutace DNA zahrnují aneuploidie, chromozomální přestavby a bodové mutace, tj. substituce, delece nebo inserce páru bází, duplikace a inverze DNA a mutace postranskripčních úprav RNA. Velké delece a inserce mohou vzniknout nerovnoměrným crossing – overem mezi nesprávně spárovanými segmenty repetitivní DNA.

Substituce představují výměnu páru bází. Jestliže je aminokyselina kódována novým kodonem totožná, jedná se o tichou mutaci (*silent mutations*), je-li odlišná, je to mutace měnící smysl (*missense mutations*). Většina missense mutací je škodlivá. Substituce může vytvořit stop-kodon, způsobující předčasné ukončení translace, což nazýváme předčasná terminace nebo nesmyslné mutace (*nonsense mutations*). Je-li deletovaný nebo inzertovaný segment jiný než násobek tří bází, kromě získání nebo ztráty kódující informace, je translační čtecí rámec porušen posunovou mutací (*frameshift mutations*) (PRITCHARD and KORF, 2003). Mutacemi může být poškozena syntéza enzymů, případně strukturní částice buňky (např. buněčné receptory), nebo je poškozena syntéza strukturního proteinu.

Zdělí-li potomek dominantně podmíněnou mutaci, může přítomnost pouze jednoho mutovaného genu zapříčinit genetickou poruchu. Projev recesivní mutace však předpokládá přítomnost dvou mutovaných recesivních genů v genotypu postiženého zvířete. Ve většině případů jsou to právě recesivní mutace, které jsou důvodem dědičných chorob u šlechtěných zvířat (ZABEK and RYS, 1998).

Monogenních genetických chorob s mendelistickým způsobem dědičnosti, kdy známe klíčovou mutaci, je například evidováno na webových stránkách OMIA u různých druhů hospodářských zvířat (I. čtvrtletí 2014) více než 562, z toho více než 93 je evidováno u skotu.

Pleiotropie popisuje expresi několika různých fenotypových znaků, způsobených jednou alelou. Většina genů má pleiotropní účinky. Stupeň penetrance je vyjádřen procentem nosičů specifické alely, kteří vykazují příslušný fenotyp.

### 2.2.1.1 Vyhodnocení frekvencí

K popisu genetického složení populace musíme specifikovat genotypy a stanovit jejich počet. Předpokládáme diploidní organismus s jedním autozomálním lokusem A, na kterém jsou umístěny dvě alely  $A_1$  a  $A_2$ . Na tomto lokusu můžeme mít tyto tři genotypy  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_2$ .



Genetické složení populace popisujeme tak, že uvádíme podíly genotypů (genotypové četnosti), buď v absolutních hodnotách nebo v procentech. Populace v genetickém smyslu je dynamickou skupinou, která je charakterizována i přenosem genů z jedné generace na druhou. Geny populace vykazují kontinuitu od generace ke generaci (JAKUBEC et al., 2003).

Genotyp heterozygota  $A_1A_2$  má po jednom genu  $A_1 = A$  a  $A_2 = a$ . Způsob označení dle ŘEHOUT et al. (2000).  $D$  = počet jedinců s genotypem  $AA$ ,  $H$  = počet jedinců s genotypem  $Aa$ ,  $R$  = počet jedinců s genotypem  $aa$ ,  $N$  = celkem jedinců. Odvození relativních počtů genotypů:  $d = D/N$ ,  $h = H/N$ ,  $r = R/N$ ; kdy  $d + h + r = 1$ .

Jelikož je každý jedinec nositelem dvou alelních genů (alel) na jednom lokusu, můžeme též z relativních genotypových četností odvodit relativní genové četnosti:  $p = d + 0,5h$ ;  $q = r + 0,5h$ .

Genetické složení populace (JAKUBEC et al., 2003), odhad genových a genotypových frekvencí vychází z Hardy–Weinbergovy rovnováhy. Pokud jsou v rodičovské generaci genové frekvence dvou alel  $p$  a  $q$ , potom se rovnají genotypové frekvence v generaci potomků výrazům  $p^2$ ,  $2pq$  a  $q^2$ .

Uvedený vztah je platný pro autozomální geny. Existují předpoklady, že dochází při gametogenezi k normální segregaci (normálnímu dělení) a že jsou genové frekvence u obou pohlaví stejné. Rovnice pro rovnovážné Hardy–Weinbergovy genotypové četnosti:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , genová (alelová) frekvence:  $p + q = 1$ .

Použití Hardy–Weinbergova zákona je užitečné pro stanovení genové frekvence recesivních alel. Odvození genové frekvence z její genotypové frekvence je možné pouze při intermediární dědičnosti, tj. v případě, že můžeme mezi sebou fenotypově rozlišit všechny tři genotypy. Za předpokladu, že jsou genotypy v Hardy–Weinbergově rovnováze, nepotřebujeme znát frekvence všech tří genotypů. Předpokládejme, že recesivní alela genu  $a$  vykazuje frekvenci  $q$  a frekvence recesivních homozygotů  $aa$  je potom  $q^2$  a genová frekvence  $q$  je opět druhou odmocninou frekvence homozygotů.

## 2.2.2 Chromozomální aberace

U hospodářských zvířat je k výskytu chromozomálních abnormalit poměrně málo údajů, většinou jsou zjišťovány v souvislosti s problémy s plodností a reprodukčními poruchami. Chromozomální abnormality dělíme na numerické a strukturní. Numerické chromozomální

aberrace dělíme na heteroploidní euploidie neboli polyploidie a heteroploidní aneuploidie. Polyploidie je výsledkem abnormálního oplození. Heteroploidní aneuploidie vyplývá z non-disjunkce homologických chromozómů během meiosis nebo mitózy (FRIES and RUVINSKY, 1999).

V lidské populaci je u 0,6 % živě narozených dětí zjišťována chromozomální vada, u mrtvě narozených je to 6 % a u spontánních abortů je to 60 % (PLACHOT and POPESCU, 1991).

Několik monozomií a trizomií bylo u skotu popsáno. Dva dobře dokumentované případy autozomální trizomie chromozómu 17 (HERZOG et al., 1977) a 18 (HERZOG et al., 1982) byly hlášeny v souvislosti s brachygnathií a nanismem. Rovněž bylo popsáno několik typů gonozomálních trizomií XXX, XXY and XYY (POPESCU, 1990).

Chromozomální poruchy mohou způsobit závažná postižení fenotypu, někteří z postižených jedinců nejsou schopni prenatalně přežít. Jsou odpovědné za velkou většinou úmrtí před narozením. Strukturní aberrace chromozómu zahrnují: translokace, delece, kruhové chromozómy, duplikace, inverze, izochromozómy. Většina z nich vzniká následkem nerekiproké výměny homologických repetitivních sekvencí mezi stejnými nebo odlišnými chromozómy, nebo v případech, kdy dojde v těsné blízkosti ke dvěma chromozomálním zlomům a enzymové reparační mechanismy vzájemně propojí chybné konce (PRITCHARD and KORF, 2003). Strukturní abnormality chromozómů dělíme na balancované, bez chybějícího nebo jinak navíc přítomného jiného chromozomálního materiálu, nebo nebalancované, s chybějícím nebo dalším chromozomálním materiálem. Balancované abnormality jsou obvykle fenotypově inertní, ačkoliv pořadí genů může být upraveno. Tyto bývají často spojovány s poruchami reprodukce, to souvisí s tvorbou nevyvážených gamet během meiozy. Nevyvážené gamety, které se podílí na oplození, jsou příčinou neživotaschopné zygoty. Abnormality jsou potomstvu předávány prostřednictvím balancovaných gamet (FRIES and RUVINSKY, 1999).

Translokace je výměna chromozomového materiálu mezi chromozómy. V genetice, nejen humánní, rozlišujeme tři typy: centrickou (Robertsonovu) fúzi, reciprokou a inzerční translokaci. Centrické fúze vznikají následkem zlomů v oblasti nebo blízkosti centromer dvou chromozómů, po nichž následuje jejich fúze. Reciproké translokace jsou interchromozómové výměny. Vzájemná výměna ramen dvou jakýchkoliv chromozómů znamená, že přenašeči těchto výměn jsou zpravidla zdraví. Translokace mají význam pro potomstvo, neboť přenašeči mohou vytvářet plody s nebalancovanou chromozomální sestavou. Při inzerční translokaci dochází k intersticiální inzerci deletovaného segmentu na jiné místo, jde většinou o vzácné případy. Balancovaní přenašeči jsou zpravidla zdraví, avšak mohou vytvářet potomstvo

s nebalancovanou chromozomální sestavou buď s duplikací nebo delecí. Delece může být intersticiální nebo terminální. K delecí může dojít na základě dvou zlomů, po nichž následuje chybná reparace. Jinou možností je nerovnoměrný crossing-over v předešlé meióze, anebo může jít o následek translokace jednoho z rodičů. Některé syndromy jsou připisovány mikrodelecím. Ring chromozómy vznikají, když dojde na stejném chromozómu ke dvěma delecím, místa zlomů se mohou navzájem propojit a vytvořit prsteneček. Toto může reálně vést k trizomii nebo monozomii. Duplikace je přítomnost dvou na sebe navazujících kopií určitého chromozomálního segmentu. Tyto aberace mohou být důsledkem nerovnoměrného crossing-overu, translokací, inverzí nebo přítomností izochromozómu jednoho z rodičů. Inverze vzniká, když po dvou chromozomálních zlomech dojde mezi oběma konci k otočení příslušného segmentu. Pokud tento úsek obsahuje centromeru, je inverze pericentrická, bez centromery paracentrická. Izochromozomy mají jedno rameno deletované a druhé duplikované. V mnoha případech bývá přítomnost izochromozómu příčinou spontánního potratu (PRITCHARD and KORF, 2003).

Nejčastější strukturální chromozomální abnormalitou u je skotu Robertsonova translokace, zahrnující poškození a následnou fúzi centromerických oblastí dvou akrocentrických chromozómů. Fúze vede ke snížení počtu chromozómů o jeden. V meióze ve fázi diakineze se oba chromozómy, podílející se na translokaci, spojí se svými volnými homology za vzniku trivalentu. Pokud je meiotická segregace normální, volné chromozómy jsou předány do jedné buňky a kondenzované chromozomy do druhé. Výsledkem jsou gamety s normální sadou chromozómů nebo s balancovanou translokací. V případě abnormální segregace jeden ze dvou volných chromozómů migruje s kondenzovanými chromozomy do dceřiné buňky, což vede k tvorbě gamet, které jsou dizomické nebo nulizomické pro jeden z chromozómů podílejících se na centrické fúzi. Po fertilizaci takové gamety způsobí vznik trizomických nebo monozomických zygot, tedy takových, které nejsou životaschopné (FRIES and RUVINSKY, 1999).

GUSTAVSSON a ROCKBORN (1964) poprvé popsali numerickou aberaci u skotu, nazvali ji 1/29 Robertsonova translokace. Od té doby tato abnormalita byla popsána u více než 50 plemen v pěti světadílech světa (PLACHOT and POPESCU, 1991).

FRIES and RUVINSKY (1999) uvádí dosud u skotu zdokumentovaných 42 odlišných typů kombinací Robertsonových translokací. Preference v používání některých plemenů při inseminaci nebo v přirozené plemenitbě, spolu s izolací populací, vedla k vysokému výskytu této abnormality u některých plemen. Příkladem jsou translokace 1/21, vyskytující se u holštýnského plemene (MIYAKE et al., 1991), nebo 14/20 a 13/2, rozšířené v chovech

simentálského skotu (WEBER et al., 1992). DYRENDHAHL and GUSTAVSSON (1979) uvádí, že translokace 1/29 může způsobit snížení plodnosti o 5–10 % v důsledku zvýšení embryonální úmrtnosti. V chovatelsky vyspělých zemích jsou využívány více či méně striktní eradikační programy, testující karyotyp všech potenciálních plemeníků a následné vyřazení nositelů vady.

## 2.3 Kongenitální vady

Kongenitální (congenitalis) znamená „existující při porodu“ a zahrnuje všechny vývojové vady bez ohledu na příčinu. Frekvence vývojových vad je v prenatálním stádiu vysoká, ale většina je eliminována spontánními potraty (PRITCHARD and KORF, 2003). BLOWEY (2003) uvádí, že asi polovina všech telat s kongenitálním postižením se rodí mrtvá.

STANĚK et al. (2012) uvádí nejednoznačnost termínu „mrtvě narozené tele“, kdy tele se narodí mrtvé nebo hyne do 24 hodin po porodu (Švédsko, Finsko, Kanada), případně do 48 hodin po porodu (v USA).

U člověka rozpoznatelnou genetickou příčinu má pravděpodobně 15–25 % vrozených vad, zjištěnou environmentální příčinu má 10 % vad, 20–25 % je podmíněno multifaktoriálně, 40–60 % je idiopatických. Faktory zevního prostředí způsobující vývojové vady se nazývají teratogeny (PRITCHARD and KORF, 2003).

Jako vývojové poruchy označujeme takové poruchy, ke kterým dochází během intrauterinního života. Jde o poruchy změn tvaru, popřípadě růstu, tj. o poruchy morfologického charakteru. Vedle těchto morfologických vývojových vad se vyskytují také vady funkčního charakteru, které nejsou zjevné při narození a vyvíjejí se teprve v dalším růstu a vývoji organismu. Jsou to většinou poruchy hormonální, poruchy metabolického charakteru, poruchy pohlavního ústrojí apod. (ZENDULKA et al., 1987).

Vývojové vady se mohou týkat znetvoření celého těla a ty označujeme jako zrůdy (monstra, terata). Teratologie je nauka, zabývající se vznikem a studiem zrůd. Jako malformace označujeme ty vývojové vady, které se týkají jednotlivých částí těla. Anomalie jsou takové vývojové úchyly, které nemají podstatný vliv na život organismu (ZENDULKA et al., 1987).

Řada látek s mutagenním účinkem působí zároveň i teratogenně, ovšem zdaleka ne všechny teratogeny jsou zároveň i mutageny. Teratogenních faktorů existuje celá řada, dělí se do tří základních skupin: chemické, fyzikální, biologické (ŠÍPEK, 2012).

Klasifikace vad: 1. Malformace jsou následky poruch objevujících se v počátečních obdobích vývoje struktur. 2. Disrupce jsou následky destruktivních procesů působících v době, kdy je orgán již vytvořen. 3. Deformace jsou poruchy způsobené abnormálními mechanickými silami. 4. Dysplazie jsou poruchy způsobené abnormální organizací buněk ve tkáních. 5. Sekvence jsou kaskádovité následky vzniklé na podkladě dřívějších abnormalit. 6. Syndromy jsou skupiny anomálií, které se trvale vyskytují společně (PRITCHARD and KORF, 2003).

Pro skot byl vypracován seznam dosud známých 43 letálních faktorů, kdy každý má svůj mezinárodní symbol označení - příloha 1, jak je uvedeno na webových stránkách ČMSCH (2010).

V mnoha případech vrozených vad zůstávají etiologie nebo predispoziční faktory neznámé. Některé specifické anomálie s neznámou etiologií se vyskytují dostatečně často, aby mohly být veterinárními lékaři v terénu snadno rozpoznány, např. *perosomus elumbis* (i když existují náznaky dědičnosti, žádná konečná příčina nebyla rozpoznána), *schistosomus reflexus* (některé zprávy s využitím analýzy rodokmenu navrhuji genetickou etiologii, ale žádný specifický defekt nebo způsob dědičnosti nebyl nalezen). Zajímavé je, že byly hlášeny případy týkající se jednoho postiženého telete a normálního sourozence dvojčete (MAXWELL et al., 2012).

## 2.4 Přehled vybraných dědičných poruch zdraví skotu

### 2.4.1 Deficit adheze leukocytů skotu

Bovine leukocyte adhesion deficiency – BLAD; gen skotu: integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit); *ITGB2* (synonymum *CD18*); chromozóm 1; NCBI kód genu: 281877.

Jedná se o letální autozomálně recesivní onemocnění holštýnského skotu.

#### Symptomy postižení BLAD

Charakteristická je silně snížená hladina exprese  $\beta 2$  heterodimerického integrinu. Integriny jsou adhezní molekuly, které zprostředkovávají vstup a přechod neutrofilů přes membrány a zničení vniknuvších patogenů (KEHRLI et al., 1992; POLI et al., 1996; NATONEK, 2000).

Mezinárodní kód pro heterozygotní nositele alely pro BLAD je „BL“, pro zdravá zvířata bez BLAD alely „TL“ (TAINTURIER et al., 1995; POWELL et al., 1996).

Silně snížená hladina exprese  $\beta 2$  heterodimerického integrinu je základní charakteristikou onemocnění BLAD u holštýnského skotu.  $\beta 2$  integriny jsou Světovou zdravotnickou organizací klasifikovány jako CD11/CD18 podle svých  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Protože exprese  $\beta 2$  integrinů vyžaduje intracelulární asociaci CD11 a CD18 podjednotek, defekty v CD18 brání expresi všech  $\beta 2$  integrinů. U neutrofilů izolovaných z telat postižených BLAD byla pozorována snížená exprese leukocytárních integrinů na povrchu buněk, snížená schopnost agregace v reakci na chemotaktické stimuly a snížená schopnost migrace přes monolayer bovinních endoteliálních buněk (PAREEK and KAMINSKI, 1996).

Defektní leukocytární adherence vede k neadekvátní imunitě sliznic a nemocná zvířata mají vážné a opakované slizniční infekce, jako je pneumonie, ulcerativní záněty dásní, záněty ozubice, papilomatóza, dermatofytóza, vypadávání zubů, tvorba hnisu, pomalé hojení ran a omezený růst. Postižená telata obvykle umírají před prvním rokem života (NAGAHATA et al., 1993, 1994, 1997; ACKERMANN et al., 1996; RIBEIRO et al., 2000). JØRGENSEN and MADSEN (1997) pozorovali u postižených zvířat horší schopnost využití potravy, tendenci k pomalejšímu růstu a nižší schopnost odpovídat na léčbu onemocnění.

Výsledky krevních testů od postižených telat ukázaly přetrvávající zřetelnou leukocytózu s převahou segmentovaných neutrofilů. Migrace neutrofilů a síla chemotaktické odpovědi byly významně sníženy. Adherentní aktivita a fagocytóza kvasinek byly rovněž značně omezené, což je důkazem, že schopnost neutrofilů fagocytovat je spojena s C3b receptorem. Markantně snížené množství CD18 na povrchu neutrofilů BLAD telat bylo prokázáno fluorescenčními histogramy (NAGAHATA et al., 1994). BLAD je často provázen hypoalbuminemií a hyperglobulinemií, častý je výskyt hypoglykémie (GOURREAU et al., 1998).

### **Detekce genetické příčiny onemocnění BLAD**

Molekulární povaha BLAD je jednoduchá bodová mutace (c.383A>G) na genu *CD18* na chromozómu 1. Výsledkem je záměna původní kyseliny asparagové za glycin na pozici 128 (D128G) v proteinu integrinu (SHUSTER et al., 1992b; JØRGENSEN et al., 1993; GERARDI, 1996; RUTTEN et al., 1996). VIANA et al. (1998) a SHUSTER et al. (1992b) popsali existenci tiché bodové mutace (c.775C>T) bez fenotypové manifestace. DNA studie s užitím restričních endonukleáz *TaqI* nebo *HaeIII* detekovaly rozdíly mezi zdravými a postiženými telaty. K detekci postižení jsou využívány metody PCR a RFLP. GERARDI (1996) pozoroval po štěpení restriktázami u zdravých zvířat 100, 200 a 300 bp proužky a u BLAD nemocných

telat proužky o délce 200 a 400 bp. VIANA et al. (1998) popsal délku fragmentů u normálních zvířat 191 a 152 bp, u heterozygotních přenašečů 343, 191 a 152 bp a u nemocných homozygotů pouze jeden proužek 343 bp. Heterozygot je zdravý, ale má fragmenty všech délek a je tedy nositelem normální i abnormální alely.

### **Výskyt onemocnění BLAD**

Původně byla obdoba onemocnění BLAD zjištěna u člověka (LAD - leukocyte adhesion deficiency) a psa (CLAD - canine leukocyte adhesion deficiency) u plemene irský setr (TROWALDWIGH et al., 1992).

LAD je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, charakterizované opakujícími se bakteriálními infekcemi, s poruchou tvorby hnisu a hojení ran, abnormalitami v rozsahu spektra přilnavosti a funkce granulocytů, monocytů a lymfoidních buněk. K charakteristice této choroby lze přičíst deficit nebo nepřítomnost specifických útvarů na povrchu buněk souvisejících funkčně a strukturálně s glykoproteiny (ANDERSON et al., 1987). PETERSEN et al. (1991) lokalizoval gen *ITGB2* (*CD18*) u člověka na 21q22.3.

U holštýnského skotu SHUSTER et al. (1992b) rozborem rodokmenů postižených potomků dospěl k prvnímu zjištěnému nositeli postižení BLAD, jedná se o býka Osborndale Ivanhoe (USA 1189870) narozeného v roce 1952. Jeho synové a vnuci měli vysokou plemennou hodnotu pro mléčnou užitkovost, byli hojně využíváni k inseminaci jednak v Americe, ale i v Evropě či jiných oblastech světa.

Býkem, který byl téměř úplně odpovědným za šíření defektu BLAD v holštýnské populaci a který měl ve Spojených státech více než 79000 dcer v oficiální kontrole užitkovosti a přes 1200 synů s dcerami, byl Carlin–M Ivanhoe Bell (USA 1667366), narozen v r. 1974. Jeho otcem byl Penstate Ivanhoe Star (USA 1441440), dědem Osborndale Ivanhoe (OLSON, 2002; PLEMDAT (2014).

Onemocnění je celosvětově rozšířeno, bylo zaznamenáno nejenom na americkém kontinentě (SHUSTER et al., 1992b), ale i v Evropě a Asii, např. v Indii (PATEL et al., 2007), Japonsku (NAGAHATA et al., 1997), Iránu (NOROUZY et al., 2005), Číně (MA et al., 2006), Polsku (CZARNIK et al., 2007c), Německu (SCHÜTZ et al., 2008), v Dánsku (JØRGENSEN et al., 1993).

POWELL et al. (1996) uvádí nejvyšší frekvenci výskytu nositelů BLAD v USA mezi býky narozenými v letech 1987 (16,7 %), 1988 (24,2 %) a 1989 (17,2 %). SHUSTER et al. (1992b) uvádí frekvenci nositelů onemocnění u US holštýnských býků 14,1 % a 5,8 % u krav. JØRGENSEN et al. (1993) uvádí u dánských plemenných býků výskyt heterozygotů 26,7 %.

V Polsku první odhady výskytu BLAD nositelů u holštýnsko - fríského skotu zjišťoval GRZYBOWSKI et al. (1994), u krav uvádí frekvenci mutantní alely 8 % a u mladých býků 15 %. CZARNIK et al. (2007c) zjistila, že výskyt nositelů BLAD mezi mladými býky (testováno 4 646 kusů) holštýnsko-fríského skotu v Polsku od roku 1995 až do roku 2006 postupně klesá, od výskytu 7,9 % (v letech 1995–1997) až po 0,8 % (roku 2006). Pokles je rovněž způsoben efektivními programy, které mají za cíl eliminovat býky – heterozygotní nositele BLAD z populace.

TAMMEN et al. (1996) uvádí v Německu výskyt 11,6 % a po zavedení ozdravných programů pokles až na 9,9 %. SCHÜTZ et al. (2008) cituje výsledky německé laboratoře, která testovala v letech 1997–2007 celkem 15521 býků holštýnského skotu na nositelství BLAD. Uvádí pokles výskytu v populaci plemenných býků z 9,4 % (1997) na 0,3 % (2007). Pokles je opět zapříčiněn selekčními opatřeními u plemenů s výskytem BLAD.

Práce řady autorů (PATEL et al., 2007; NOROUZY et al., 2005; MA et al., 2006) uvádějí v zemích jako je Indie, Irán, Čína frekvenci BLAD nositelů v rozsahu přibližně 0,8–3,45 %.

## **2.4.2 Komplex vertebrálních malformací**

Complex vertebral malformation – CVM; gen skotu: *SLC35A3* (solute carrier family 35 member 3), UDP-N-acetylglucosamine (*UDP-GlcNAc*) transporter member A3; chromozóm 3; NCBI kód genu: 23443.

V roce 2001 vědci v Dánském institutu zemědělských věd identifikovali gen a mutaci, zodpovědné za tuto chorobu. Dne 28.9.2001 Holstein Association USA a National Association of Animal Breeders ohlásily, že CVM bylo uznáno za genetické onemocnění, postižení jsou jedinci plemene holštýn.

### **Symptomy postižení CVM**

Typické znaky CVM jsou zkrácený krk, vertebrální abnormality zahrnují fúzi posledních dvou krčních obratlů a distorzi prvních tří hrudních obratlů, což vede v tomto místě k mírné skolióze. U předních končetin je zjišťován 10–20 ° ohyb karpálních kloubů a 30–90 ° ohyb spěnkových kloubů, kombinovaný s mírnou laterální rotací prstů. Zadní končetiny vykazují bilaterální, symetrické ohnutí nebo extenzi tarzálních kloubů, ohyb spěnky s mediální rotací prstů. Vyšetření srdce ukázalo pravostrannou hypertrofii a defekt horního



mezikomorového septa. Aorta i plicní tepna vychází z pravé strany srdce. Srdeční abnormality se vyskytují u 50 % případů (REVELL, 2001; PAZDERA, 2001; AGERHOLM et al., 2001).

BENDIXEN (2001) uvádí, že více než 63 000 dánských holštýnských krav se sníženou plodností, vykazovalo významně často postižení plodu CVM. Řada CVM plodů je potracena v průměru 169,8 den gestace, jiná CVM telata jsou potracena nebo se narodí mrtvá 223.–288. den březosti, případně brzo po porodu umírají (AGERHOLM et al., 2001, 2004). Je-li plod homozygotní pro CVM, 29 % krav potratí do 100. dne březosti, 45 % ve 150. dni a 77 % potratů je zaznamenáno 260. den (NIELSEN et al., 2003).

### **Detekce genetické příčiny onemocnění**

Defekt způsobuje mutace v autozomálním genu *SLC35A3* s recesivní dědičností u holštýnského skotu (REVELL, 2001; BENDIXEN et al., 2002; AGERHOLM et al., 2004; THOMSEN et al., 2006). Gen *SLC35A3* kóduje transportní enzymy hrající roli při vývoji axiálního skeletu (THOMSEN et al., 2006). *SLC35* kóduje enzymy, které se zabývají transportem cukrů z cytosolu do lumenu endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu (ISHIDA and KAWAKITA, 2004). V těchto organelách jsou cukry využívány glykosyltransferázou k syntéze řetězců glykoproteinů, glykolipidů a uhlovodíkových polymerů (GOTO et al., 2001). Vlivem mutace dochází k abnormální glykosylaci proteinů v tkáních postižených zvířat. Nedostatečnost v transportu UDP-N-acetylglukosaminu do Golgi lumenu působí na malformace páteře. Případy CVM dosud studované jsou způsobeny substitucí (c.559 G>T) v genu *SLC35A3*. Místo se nachází v exonu 4 (THOMSEN et al., 2006; KANAE et al., 2005). Valin na pozici 180 je nahrazen fenylalaninem (THOMSEN et al., 2006).

Heterozygoti jsou fenotypově zdraví a jejich produkce není postižena. Heterozygotní přenašeči jsou označeni kódem „CV“ ve všech rodokmenech a podobných dokladech o původu, geneticky zdraví jedinci jsou označeni kódem „TV“. Tyto kódy jsou mezinárodně uznávané a standardizované.

RUŠĆ and KAMINSKI (2007), CHU et al. (2008) popisují detekci heterozygotních nositelů CVM metodou PCR-SSCP (polymorfismus konformace jednořetězců). GHANEM et al. (2008) typizoval DNA alelicky specifickou AS-PCR reakcí. Použity byly 2 sety primeru forward (F): I. normální alela s G (wil dtyp); II. CVM alela s T (mutant typ). Jeden společný reversní (R) primer byl použit jak s forward primerem wild typu, tak i mutant typem. Pro každé zvíře tak byly provedeny 2 vzorky (FW-R) a (FM-R). Velikost PCR produktu byla 395 bp.

Jako kontrolní vzorky byly použity již prokázané vzorky CVM nositele a zdravého zvířete. Následně u zvířat, která byla pomocí AS-PCR identifikována jako nositelé CVM, byla

provedena sekvenace charakteristického úseku DNA. Tím byla u nositelů CVM zjištěna bodová mutace (c.559 G>T).

### **Výskyt onemocnění CVM**

Onemocnění bylo prvně detekováno v dánské populaci holštýnského skotu na základě již zavedeného programu, od r.1989, k rozpoznávání genetických vad u skotu. V roce 1999 byl pozorován zvýšený výskyt případů specifických malformací u předčasně narozených telat u holštýnské populace, v roce 2000 bylo toto dědičné onemocnění označeno jako CVM a na základě analýz rodokmenů byli zjištěni i první heterozygotní nositelé onemocnění (Agerholm et al., 2001). Následně v roce 2001 byly popsány první případy CVM postižených předčasně narozených telat i u amerického holštýnského skotu (DUNCAN et al., 2001).

Defekt CVM byl zpětně vystopován k americkému vynikajícímu plemníkovi Carlin-M Ivanhoe Bell (USA 1 667 366, narozen 1974). Bell byl předtím jako otec užíván po celém světě a celkový dopad na mortalitu holštýnských telat byl značný (Agerholm et al., 2001; KONERSMANN et al., 2003). Posléze bylo zjištěno, že nositelem byl již jeho otec Penstate Ivanhoe Star (USA 1 441 440, narozen 1963) a děd Osborndale Ivanhoe (USA 1 189 870, narozen 1952). Výskyt tohoto onemocnění byl v různé míře zaznamenán ve velké části světa v oblastech s rozvinutým chovem holštýnského skotu.

Údaje publikované NAAB HOLSTEIN ASSOCIATION USA (2001) uvádí, že v době publikování zprávy bylo nejméně 15 % top holštýnských býků v USA nositeli CVM.

Berglund et al. (2004) genotypizací 228 švédských holštýnských býků narozených v letech 1995–1999 potvrdil výskyt 53 CV heterozygotů (23 %).

SCHÜTZ et al. (2008) uvádí výsledky jedné německé laboratoře, kde bylo provedeno 14493 testů na CVM (od roku 2002–2007), z toho 12 004 u býků. U CVM tato laboratoř zaznamenala v letech 2002 a 2007 pokles výskytu z 8,3 % na 2,3 %. Pokles byl zapříčiněn monitoringem a selekčními opatřeními zavedenými v Německu v souvislosti s tímto onemocněním. V Polsku byl výskyt CVM u krav odhadován na 5–10% (OSTEN-SACKEN et al., 2004). CHU et al. (2008) uvádí 15% frekvenci heterozygotů vyšetřením 68 top plemenných býků holštýnského skotu chovaných v Číně, 282 nositelek bylo nalezeno mezi 602 vybranými samičími potomky 10 býků.

### **2.4.3 Citrulinémie skotu - deficit aktivity kyselá argininosukcinátsyntetázy**

Citrullinaemia - Argininosuccinate synthase deficiency - ASS1; gen skotu: argininosuccinate synthase 1, ASS; chromzóm 11; NCBI kód genu: 280726.

#### **Symptomy postižení**

Citrulinémie skotu je autozomálně recesivně podmíněná porucha metabolismu močovinny, charakterizovaná vysokými hladinami citrulinu v plazmě, což je výsledkem deficitu aktivity kyselá argininosukcinátsyntetázy (ASS) (WALSER, 1983). Příčinou je nedostatečná aktivita jednoho z enzymů ornitinového cyklu, argininosukcinátsyntetázy (PADEERI et al., 1999). Argininosukcinátsyntetáza katalyzuje sloučení citrulinu s aspartátem na argininosukcinát za současné hydrolyzy ATP na AMP a anorganického pyrofosforečnanu. Je to primární krok přeměny amoniaku na močovinu v urátovém cyklu v játrech (BRUSLOW AND HORWICH, 1989).

Postižená telata v prvním týdnu života mají neurologické postižení postupující do kómatu. Telata homozygoti recesivní hynou v prvním týdnu života v důsledku hyperamonemie (HARPER et al., 1986a). U postižených telat je nedetekovatelná aktivita ASS (DENNIS et al., 1989).

V popisovaných případech u postižených telat narůstala koncentrace citrulinu (dalších aminokyselin) v séru i plazmě, mozkomíšním moku, v mozkové tkáni. Bezprostředně po narození se mláďata jevila normální, během prvního a druhého dne se zhoršil příjem potravy. V následujících dnech se začala projevovat otupělost, periodické vysouvání jazyka, nastalo bezcílné bloudění, 4. nebo 5. den telata již jen ležela, měla křeče, došlo k nárůstu tělesné teploty až na 40 °C s následnou smrtí. U postižených telat byl zjištěn cerebrokortikální edém (HEALY et al., 1990a).

#### **Detekce genetické příčiny onemocnění**

Lokus pro ASS je u skotu lokalizován na 11. chromozómu. Normální bovinní ASS je peptid o 412 aminokyselinách (NCBI, 2009).

Mutace - tranzice cytosinu na thymin způsobuje změnu 86. kodonu z CGA na TGA v exonu 5 genu argininosukcinátsyntetázy. Kodon CGA pro arginin se změnil ve viníka mutace v kodon TGA. Tento kodon je terminální (nekódující), takto modifikovaný enzym je neaktivní (DENNIS et al., 1989).

Amplifikace lokusu pro ASS a detekce mutace na kodonu 86 byla prováděna metodou PCR-RFLP. DENNIS et al. (1989) vytvořili molekulární test, který umožňuje identifikaci

nositelů mutace. Tranzice cytosinu na thymin v kodonu 86 způsobuje ztrátu restričního místa pro *AvaII*. Amplifikát fragmentu genu o délce 194 bp se vlivem *AvaII* u zdravého zvířete rozdělí na fragmenty 118 bp a 72 bp. Postižený homozygot recesivní se vlivem restriktázy *AvaII* nerozdělí na fragmenty – ztráta restričního místa vlivem mutace – fragment 194 bp. Heterozygoti mají 3 fragmenty: 194, 118 a 72 bp.

### **Výskyt onemocnění**

Onemocnění bylo poprvé popsáno u člověka (MCMURRAY et al., 1961), u skotu bylo identifikováno např. v australské populaci holštýnsko – fríského skotu (HARPER et al., 1986a). HEALY (1996) uvádí, že původním šířitelem citrulinémie v australské populaci holštýnského skotu, během 80. let minulého století, byl kanadský býk zlepšovatel Linmark Kriss King. Stal se zakladatelem významné australské linie holštýnského skotu. Healy uvádí 13,3% prevalenci heterozygotů mezi australskými plemenými býky v letech 1988 a 1990.

WINDSOR and AGERHOLM (2009) uvádí ve svém článku nepublikované výsledky Tammaena, kdy bylo zjištěno v australské populaci holštýnských býků narozených v letech 1955–2001 2,27 % nositelů genu onemocnění z celkem 1494 vyšetřených zvířat.

### **2.4.4 Deficit uridin-5'-monofosfát syntázy**

Deficiency of uridine monophosphate synthase – DUMPS; gen skotu: uridine monophosphate synthetase; *UMPS*; chromozóm 1; NCBI kód genu: 281568.

#### **Symptomy postižení DUMPS**

DUMPS je geneticky založená porucha ovlivňující biosyntézu pyrimidinu, jednoduše děděná jako dvoualelový lokus na autozómu (SHANKS et al., 1992, KUHN et al., 1994). Enzym uridin-5'-monofosfát syntáza (UMPS) katalyzuje přeměnu kyseliny orotové na UMP, který je prekurzorem všech dalších pyrimidinových nukleotidů a zároveň je i běžnou složkou mléka krav a dalších přežvýkavců (SHANKS et al., 1987).

Postižené krávy produkují mléko s pět až desetkrát vyšší koncentrací kyseliny orotové, než je běžné, vyšší hladiny byly zjišťovány v různých stádiích laktace a v různých laktacích. Kyselina se také vylučovala do moči a krve laktujících zvířat. SHANKS a ROBINSON (1990) dospěli k závěru, že je-li enzym UMP syntáza deficientní, dochází k akumulaci kyseliny orotové. U heterozygotních nosičů poruchy je v erytrocytech, játrech, slezině, ledvinách,

svalech a mléčné žláze snížena aktivita enzymu UMP syntázy na polovinu normálních hodnot (SHANKS and ROBINSON, 1990; SCHWENGER et al., 1994). Praktickým dopadem tohoto defektu je to, že krávy přenašečky vykazují vyšší četnost dřívějšího přebíhání, protože jejich březost je ukončena časným spontánním abortem (FRIES and RUVINSKY, 1999).

### **Detekce genetické příčiny onemocnění DUMPS**

DUMPS způsobuje bodová mutace - tranzice, kdy cytozin je nahrazen thyminem na kodonu 405 v exonu 5. Místo kodonu pro arginin (CGA) vzniká stop kodon (TGA), který má za následek vznik zkrácené c-terminální katalytické podjednotky proteinu (SCHWENGER et al., 1993; VIANA et al., 1998). Gen pro UMP syntázu byl v bovinním genomu lokalizován na chromozomu 1q31-36 (HARZILIUS et al., 1996).

Možný postup při odhalení recesivní alely (SCHWENGER et al., 1993; GRZYBOWSKI et al., 1998) je následující. Produkt PCR byl štěpen restriktázou *AvaI*. Výsledné fragmenty byly analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu. Normální homozygoti ukazují bandy 53, 36 a 19 bp, heterozygoti 89, 53, 36 a 19 bp, recesivní genotyp je 89 a 19 bp. Označení „DP“ je přiřazeno ke jménu známého heterozygota přenašeče a uváděno v oficiálních rodokmenech, geneticky zdravá zvířata nesou označení „TD“ (SHANKS and ROBINSON, 1990).

### **Výskyt onemocnění DUMPS**

Onemocnění DUMPS bylo poprvé zjištěno u holštýnského plemene v USA (SHANKS et al., 1987). V Argentině POLI et al. (1996) zjistil mezi holštýnskými býky 1,79 % a u krav 0,96 % přenašečů DUMPS.

Známa je i lidská podoba tohoto onemocnění - deficeence enzymu UMPS - dědičná orotová acidurie s autozomálně recesivní dědičností.

## **2.4.5 Deficit kyselé maltázy - generalizovaná glykogenóza**

Glycogen storage disease II – Generalised glycogenosis – GSD II; gen skotu: acid alpha-glucosidase; *GAA*; chromozóm 19; NCBI kód genu: 280798.

### **Symptomy postižení GSD II**

GSD II je porucha ukládání glykogenu II. typu, jedná se o autozomálně recesivní genetické onemocnění, jehož příčinou je závažný nedostatek aktivity kyselé glukosidázy *GAA*

(acidic  $\alpha$ -glucosidase). GAA je lysozomální enzym, který katabolizuje glykogen na glukózu. Deficience jeho aktivity má za následek generalizovanou glykogenózu – GSD II. Průměrná GAA aktivita u postiženého skotu se pohybuje od 1 % v fibroblastech, 3 % v krevních leukocytech, a až 9 % ve svalech (REICHMANN et al., 1993; O'SULLIVAN et al., 1981; DENNIS et al., 2000).

Generalizovaná glykogenóza byla nejprve popsána u masného shorthornského skotu (RICHARDS et al., 1977; PALMER et al., 1994) a brahmanského skotu (O'SULLIVAN et al., 1981) v Austrálii. Klinické příznaky mohou být patrné od narození do 6 měsíců věku, s délkou života do 12 měsíců. Projevem glykogenózy u brahmanského i shorthornského skotu je progresivní svalová slabost, zvířata jsou celkově slabá, případně s nervovými příznaky jako nekoordinovaná chůze (RICHARDS et al., 1977, O'SULLIVAN et al., 1981, REICHMANN et al., 1993). O'SULLIVAN et al. (1981) zjistil, že rodiče postižených telat měli přibližně poloviční úroveň aktivity GAA ve srovnání s normálním dobyt看em.

REICHMANN et al. (1993) popsal toto postižení u 96 telat brahmanského skotu. Typický projev pro GSD II byl ve věku 6 měsíců, špatný růst a svalová slabost byly nejběžnějšími příznaky. Byla zjištěna snížená aktivita GAA v lymfocytech periferní krve a kosterní svalovině. Koncentrace glykogenu ve svalech byla u postižených zvířat trvale vyšší ve srovnání s klinicky zdravým skotem. U postižených zvířat byla biochemicky zjištěna zvýšená aktivita aspartátaminotransferázy a kreatinkinázy, v moči bylo zjištěno nadměrné množství oligosacharidů. Histologicky byly zjištěny jemné vakuolizace cytoplazmy neuronů v mozku a míše, kosterních svalech, myokardu a Purkyňových vláken.

U člověka je postižení známo pod názvem Pompeho nemoc (nebo deficience kyselé maltázy), onemocnění poprvé popsal dánský patolog J. C. Pompe (HIRSCHHORN et al., 2001). U člověka se rovněž jedná o deficit lysozomální hydrolázy (GAA). Katalyzuje hydrolýzu  $\alpha$ -1,4 a  $\alpha$ -1,6 glykosidických vazeb. Intralysozomální akumulace glykogenu normální struktury ve všech tkáních. Následkem je akumulace glykogenu např. v myokardu, kosterním svalstvu, játrech (generalizovaná forma). Lze rozlišit 3 formy onemocnění, infantilní je nejtěžší, dále juvenilní a adultní. Charakteristická je hypoglykemie, svalová slabost, psychomotorická retardace, imobilizace, úbytek svalové hmoty. Děti a dospívající jsou celkově slabí, zaostávají ve vývoji. Vyskytují se poruchy vědomí, křeče při hypoglykémii, hypotonie, kardiomyopatie a respirační selhání bývají příčinou předčasné smrti (BAETHMAN et al., 2008). Klinický projev bovinní generalizované glykogenózy se více podobá juvenilní formě lidského onemocnění (REICHMANN et al., 1993).

## Detekce genetické příčiny onemocnění GSD II

Příčinou GSD II jsou mutantní alely genu kyselé  $\alpha$ -glukosidázy GAA, které způsobují ztrátu funkce tohoto lysozomálního enzymu, jenž katabolizuje glykogen na glukózu. Gen se nachází u skotu v 19. chromozómu (TAMMEN et al., 2000).

V genu pro GAA se vyskytuje několik mutací s různým efektem včetně letálního. Letální charakter má mutace delece dinukleotidu v exonu 7, označení jako mutace „E7“, c.1057\_1058delTA, u brahmanského skotu je hlavní příčinou generalizované glykogenózy, způsobuje posun a vznik stop kodonu v exonu 8 na pozici nukleotidů 1170–1172 (DENNIS et al., 2000).

Méně častá je tranzice v exonu 13, označovaná jako letální mutace "E13", c.1783C>T, u brahmanského skotu s předpokladem náhrady argininu na pozici 595 stop kodonem (DENNIS et al., 2001, 2002).

Rovněž delece dinukleotidu v exonu 18, c.2454\_2455delCA, u shorthornského skotu vede k frameshiftu a vzniku stop kodonu v exonu 19 v nukleotické pozici 2637–2639, tedy k předčasnému ukončení translace. Následkem je neaktivní peptid zkrácený o 60 aminokyselin (DENNIS et al., 2000, 2001). Tato mutace nebyla zjištěna u postiženého brahmanského skotu.

Ve spojitosti s generalizovanou glykosidózou byla zjištěna na exonu 16 u brahmanského skotu tichá mutace c.2223G>A, týká se nezměněné aminokyseliny Leu714, zjišťovaná restriktázou *MspI* v souvislosti s letální mutací „E7“, výskyt byl rovněž popsán u 33 postižených kusů (DENNIS et al., 2000). U postižených shorthornů oproti brahmanskému skotu nebyly zjištěny již uvedené mutace na E7 případně na E16 (DENNIS et al., 2000).

Rovněž jednobázová substituce tranzicí v exonu 9 označení jako „E9“, c.1351C>T, p.arg 451trp, brahmanského skotu je zodpovědná za 70–80% snížení aktivity GAA, ale není spojována s klinickým onemocněním (DENNIS et al., 2000, 2002).

Australská asociace chovatelů brahmanského skotu iniciovala vývoj testů, které by preventivně odhalovaly přítomnost heterozygotních nositelů onemocnění GSD II.

Níže uvedené genotypizace byly vizualizovány na 4% agarózovém gelu s ethidium bromidem.

Genotypizace místa 1057, brahmanský skot: ampikon (cDNA) o velikosti 238 bp je restriktázou *BglII* rozštěpen u wild typu na fragmenty 190 bp a 48 bp. U mutace (c.1057\_1058delTA) fragment 188 bp je rozštěpen *BglII* na fragmenty 161 a 27 bp.

Genotypizace místa 1351, brahmanský skot: ampikon (cDNA) 179 bp je restriktázou *BglII* rozštěpen na dva fragmenty (98 a 81 bp) pro 1351 C a 1351 T ampikony. Fragment pro 1351C ampikon je rozštěpen na fragment 68 a 30 bp.

Genotypizace místa 1783, brahmanský skot: amplifikační procedura (cDNA) byla navržena tak, že zahrnovala dvě *BsiEI* místa kromě míst prezentovaných wildtypovým amplikonem. Rozklad amplikonu 192 bp restriktázou *BsiEI* na fragmenty 22 bp a 15 bp u amplikonů (1783 C i 1783 T). Kromě toho fragment 39 bp je odštěpen ze zbytkového 155 bp fragmentu amplikonu 1783 C, zbyde fragment 116 bp, avšak u amplikonu 1783 T zbyde fragment 155 bp (DENNIS et al., 2002).

Genotypizace místa 2454, shorthornský skot, původně publikovaný postup: tvorba PCR produktů, genotypizace při použití restriktázy *DrdI* zdravý (wildtypový) homozygot (2454CA) má na gelu fragmenty o velikosti 155 bp a 129 bp. Homozygotní mutant (2454 $\Delta$ CA) se prezentuje na gelu neštěpeným PCR produktem 284 bp. Heterozygot (2454CA/ $\Delta$ CA) má na gelu fragmenty 284 bp, 155 bp a 129 bp (DENNIS et al., 2000, 2001).

Bylo zjištěno, že tento postup neposkytuje přesné výsledky u vzorků čištěné DNA izolované z chlupových cibulek, protože docházelo z neznámých příčin k inhibici restriktázy *DrdI*. Proto byla stejnými autory pro genotypizaci zvolena jiná metoda, umožňující univerzální genotypizaci DNA z krve, spermatu i chlupových cibulek.

Genotypizace místa 2454 pomocí dvojitého nesouladného amplifikačního postupu k rozlišení alel exonu 18 dle DENNIS et al. (2001). Přítomnost či nepřítomnost unikátních štěpných míst v exonu 18 pro *DrdI* a *PshAI* je významná. Mutace dinukleotidová delece c.2454\_2455delCA způsobí zánik štěpného místa pro *DrdI*, ale rovněž vznik unikátního štěpného místa pro *PshAI* uvnitř exonu 18 AAG genu. Pomocí tohoto postupu jsou do primerů zabudována restrikní místa pro *DrdI* a *PshAI*. Detekční štěpné místo pro *DrdI* se nachází 129 bp od 5' konce wildtypového amplikonu, ale v mutantním amplikonu není přítomno. Nesouladné štěpné místo pro *DrdI* je 25 bp od 5' konce obou wildtypového a mutantního amplikonu, které slouží jako vnitřní kontrola štěpení *DrdI*. Naopak detekční štěpné místo *PshAI* se nachází 127 bp od 5' konce mutantního amplikonu, ale nevyskytuje se u amplikonu wildtypového. Nesouladné štěpné místo pro *PshAI* je 12 bp od 3' konce obou amplikonů wildtypového i mutantního, které slouží jako vnitřní kontrola *PshAI* štěpení.

Průběh genotypizace: wildtypový a mutantní amplikon mají velikost 262 bp respektive 260 bp. Alikvoty PCR produktů byly inkubovány dvojicí restriktáz *DrdI* a *PshA*. Amplikon 262 bp u homozygotního wild typu, restrikcí s *DrdI* vyštěpí dva viditelné fragmenty 104 bp a 133 bp. Při použití restriktázy *PshAI* je viditelný pouze fragment 250 bp. Amplikon 260 bp u homozygotního mutantního typu (delece dinukleotidu) působením restriktázy *DrdI* vyštěpí viditelný fragment 235 bp a působením restriktázy *PshAI* vyštěpí viditelné fragmenty 127 a 121 bp. Fragmenty 235, 133 a 104 bp byly sledovány po štěpení *DrdI* restriktázou



u heterozygotů. Při použití restriktázy *PshAI* u heterozygotů vznikly fragmenty 250, 127 a 121 bp (DENNIS et al., 2001).

### **Výskyt onemocnění GSD II**

Onemocnění bylo zjištěno u australského skotu brahmanského a masného shorthornského plemene (JOLLY et al., 1977; RICHARDS et al., 1977; O'SULIVAN et al., 1981; HOWELL et al., 1981; HERS et al., 1989) rovněž i u dalších druhů zvířat, ovcí (MANKTELOW et al., 1975), psů (MOSTAFA, 1970), koček (SANDSTROM et al., 1969), křepelek (MURAKAMI et al., 1980; MATSUI et al., 1983).

### **2.4.6 Glykogenóza V**

McArdle's disease – Glycogenesis V – Glycogen storage disease V – GSD V; gen skotu: phosphorylase glycogen muscle; *PYGM*; chromozóm 29; NCBI kód genu: 327664.

### **Symptomy postižení GSD V**

Glykogenóza V skotu je dědičná porucha s monogenní autozomálně recesivní dědičností, tuto skutečnost poprvé popsal a na základě analýzy rodokmenů postižených jedinců plemene charolais doložil ANGELOS et al. (1995). Jedná se o svalovou chorobu, která je způsobena bodovou mutací genu s označením *PYGM*, kódujícího enzym myofosforylázu (glykogenfosforylázu) (TSUJINO et al., 1996; SOETHOUT et al., 2002; IBEAGHA et al., 2008). U člověka je tato porucha známa jako McArdleho choroba, toto onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1951 Dr. Brianem McArdlem (MCARDLE, 1951, ANDREU et al., 2007).

Glykogenfosforyláza iniciuje členění glykogenu fosforolytickým odstraněním  $\alpha$ -1,4-glukosyl reziduí z krajních větví glykogenu. Tři isozymy (typ svalový, jaterní a mozkový) byly popsány u savců a genetické defekty svalového isozymu (myofosforyláza) u lidí vedou k metabolické myopatii známé jako glykogenóza typu V neboli McArdleho choroba (MCARDLE, 1951; MOMMAERTS et al., 1959). Typičtí pacienti s touto nemocí mají intoleranci ke cvičení, s předčasnou únavou, svalovou bolestí, křečemi svalů při výkonu a opakující se myoglobinurií (ENGEL et al., 1994).

Telata s fenotypem zdvojeného osvalení, která jsou podezřelá z deficitu myofosforylázy, vykazovala typické příznaky např. čirou, hnědě zbarvenou moč po námaze, zátěžovou intoleranci, příznaky bolesti, zvýšení úrovně kreatinkinázy (SOETHOUT et al., 2002).

## **Detekce genetické příčiny onemocnění GSD V**

Myofosforylázový deficit u skotu je svalové onemocnění indukované bodovou mutací, substitucí tranzicí C>T v kodonu 489 myofosforylázového genu (TSUJINO et al., 1996), kdy dochází k p.Arg489Trp, náhradě argininu kódovaného CGG tryptofanem TGG a vzniku cílové sekvence CCTTGG pro restriční enzym *StyI* (BILSTROM et al., 1998). PCR produkt má délku 252 bp (BILSTROM et al., 1998; SOETHOUT et al., 2002). Následně působením restriktázy *StyI* byly zjištěny genotypy: mutace v exonu 12 bovinního myofosforylázového genu, tj. postižená zvířata homozygoti 119 a 133 bp, homozygotní zvířata nepostižená 252 bp, heterozygoti 252 bp, 119 bp, 133 bp (SOETHOUT et al., 2002).

## **Výskyt onemocnění GSD V**

Onemocnění bylo zjištěno u skotu plemene charolais (ANGELOS et al., 1995; JOHNSTONE et al., 2004), u kříženců plemene blonde d'Aquitaine (SOETHOUT et al., 2002) a rovněž u merinových ovcí v Austrálii (TAN et al., 1997).

## **2.4.7 Deficit krevního koagulačního faktoru XI**

Factor XI deficiency; gen skotu: Coagulation factor XI; *F11*; chromozóm 27; lokace 27q14; NCBI kód genu: 407998

### **Symptomy postižení - deficitu FXI**

Koagulační faktor XI je jedním z více než tuctu proteinů podílejících se na srážení krve. Koagulační onemocnění krve - deficit koagulačního faktoru XI, bylo prvně popsáno u amerického holštýnského skotu ve státě Ohio v roce 1969 (KOCIBA et al., 1969).

Zjištění deficitu faktoru XI u holštýnského skotu, bylo jedním z prvních biochemických defektů, jejichž příčinou byl narušený projev proteolytického enzymu (GENTRY et al., 1975).

Zvířata s deficitním XI faktorem mohou projevovat velmi široký rozsah příznaků, od úplně bezpříznakových, až růžově zbarvené kolostrum, krev v mléce (HATON et al., 2000), dlouhodobé krvácení po injekci, odrohování, anemie nebo vnitřní krvácení (MARRON et al., 2004; KUNIEDA et al., 2005). Zvířata s homozygotně recesivní či heterozygotní konstitucí alel v lokusu mohou mít nižší produkci telat a nižší míru přežití (GENTRY and ROSS, 1994; LIPTRAP et al., 1995; COOMBER et al., 1997). Postižená zvířata jeví vyšší vnímavost k infekčním onemocněním, jako jsou pneumonie, mastitidy a metritidy (GHANEM et al., 2005). Projev

tohoto genetického defektu může mít ekonomický dopad v mléčném průmyslu (MARRON et al., 2004).

Faktor XI je plazmová serinová proteináza zapojená v počáteční aktivaci krevní koagulační kaskády. Během aktivace vlastního mechanismu srážení krve je faktor XI převeden z neaktivní zymogenní formy na proteolytický enzym (faktor XIa). Tento aktivovaný protein iniciuje následný krok v koagulační části, která vrcholí tvorbou fibrinu z rozpustného fibrinogenu (GENTRY and DOWNIE 1977; BRUSH et al., 1987). Koagulační faktor XI je glykoprotein, vznikající v játrech. Faktor XI obíhá jako disulfidicky spojený homodimer, složený ze dvou identických podjednotek a je převeden na aktivní proteázu rozštěpením (BOUMA and GRIFFIN, 1977).

Strukturu faktoru XIa (aktivovaná forma XI) tvoří dva těžké a dva lehké řetězce. Čtyři „oblasti“ těžkého řetězce (MCMULLEN et al., 1991) mají vazebná místa pro trombin, faktor IX, faktor XII a molekulárně těžký kininogen (BAGLIA et al., 1990, 1993; BAGLIA and WALSH, 1996; SUN and GAILANI, 1996). Lehký řetězec obsahuje katalytické místo serinové proteázy (KUNIEDA et al., 2005).

### **Detekce genetické příčiny deficitu FXI**

Dříve se předpokládalo, že deficit FXI je způsoben absencí FXI proteinu (GENTRY, 1984). MARRON et al. (2004) identifikoval mutaci, která je příčinou deficiencie FXI, kdy bílkovina je pravděpodobně přítomna, ale jen se zkrátila předčasně, vlivem inserce stop kodonu v exonu 12 na chromozómu 27. Výsledkem je absence činnosti faktoru XI. Zralý protein je změněn ve struktuře a veškerá serinová oblast kódovaná exony 13–15 chybí (ASAKAI et al., 1987).

Analýza rodokmenů zvířat s mutací exonu 12 indikuje, že deficit FXI je autozomálně recesivní onemocnění s heterozygotními jedinci vykazujícími různorodé symptomy a různě stupně snížení aktivity FXI (GENTRY et al., 1975; MARRON et al., 2004).

KUNIEDA et al. (2005) uvádí druhý způsob mutace bovinního genu faktoru XI. Inserce 15 bp v exonu 9 způsobuje aminokyselinovou substituci 6 aminokyselinových zbytků ve čtvrté oblasti. Účinky obou mutací na funkci FXI mohou být rozdílné.

Tyto výsledky jsou shodné s typem mutací a způsobem dědičnosti sledovaným u člověka. Využívání molekulární diagnostiky recesivních onemocnění je tedy výhodné i v péči o genetické zdraví populace zvířat. Důležitá je přesná identifikace zvířat, která se mohou zdát klinicky normální, ale nesou mutaci v exonu 12. Genotypizace pomocí PCR, primery byly konstruovány dle MARRONA et al. (2004) na základě homologie mezi vhodnou lidskou a myší

*FXI* sekvencí. Pomocí primerů forward a reverse byla příslušná část genu amplifikována. Nepostižená zvířata homozygoti s normálními *FXI* alelami mají jeden 244 bp fragment. U postižených homozygotů je fragment o délce 320 bp, heterozygotní nositelé se projevují oběma fragmenty 244 bp a 320 bp (MARRON et al., 2004).

### **Výskyt deficitu FXI**

Deficit faktoru XI, byl zjištěn u amerického a kanadského holštýnského skotu (KOCIBA et al., 1969; GENTRY, 1975), holštýnského skotu v Anglii (BRUSH et al., 1987). Japonští autoři uvádí výskyt deficitu faktoru XI u japonského černého skotu (wagyu), kde genetická příčina se poněkud liší od příčiny u holštýnského skotu (KUNIEDA et al., 2005; WATANABE et al., 2006; OHBA et al., 2007).

Průzkum 169 kusů kanadského holštýnského skotu zjistil 21 heterozygotů pro faktor XI. Frekvence mutagenního genu byla 0,6 %. Relativní četnost recesivních homozygotů v populaci byla 0,1–0,8 % a pro heterozygoty četnost byla 4–16 % (GENTRY et al., 1980). MEYDAN et al. (2009) uvádí výskyt deficitu faktoru XI u holštýnského skotu v Turecku. Analyzoval 225 krav, zjistil 4 heterozygotní nosiče pro deficit faktoru XI. Všechna ostatní zvířata měla normální genotyp. Frekvence mutantní *FXI* alely byla 0,9 % a prevalence přenašečů byla vypočtena na 1,8 %.

U plemenných býků amerického holštýna byl zjištěn výskyt 5 přenašečů mutantní alely deficiencie faktoru XI ze 419 testovaných (MARRON et al., 2004), tedy 1,2 %. U indického holštýnského skotu plemenných býků byl zjištěn výskyt 0,6 % heterozygotních přenašečů (RAJESH et al., 2007).

Deficit faktoru XI byl popsán nejen u skotu, ale i některých plemen psů, teriérů (DODS and KULL, 1971; KNOWLER et al., 1994). Největší výskyt deficitu faktoru XI v lidské populaci se zdá být u Židů původu Ashkenazi (SELIGSOHN, 1978).

### **2.4.8 Arachnomelie – „syndrom pavoučích nohou“**

Spider legs syndrome; Arachnomelia and arthrogryposis (SAA), Arachnomelia syndrome (AS);

U simentálského plemene a fleckvieh: gen skotu: molybdenum cofactor synthesis 1; *MOCSI*; chromozóm 23; NCBI kód genu: 281917.

U švýcarského hnědého skotu (braunvieh): gen skotu: sulfite oxidase; *SUOX*; chromozóm 5; NCBI kód genu: 509837.

### **Symptomy postižení AS**

Arachnomelia syndrom je letální monogenní autozomálně recesivní dědičné postižení skotu. Heterozygotní přenašeči jsou bez klinických příznaků. Postižená telata umírají v období porodu, zjišťovány jsou malformace skeletu nohou, páteře a lebky. Arachnomelie je kongenitální abnormalita kosterního a svalového systému, typické jsou především prodloužené, tenké a lámavé kosti končetin s hyperflexibilními nebo zkrácenými karpálními, tarzálními a spěnkovými klouby (*arthrogryposis*), dávající zvířeti „pavoučí“ vzhled. (BREHM et al., 1984; KÖNIG et al., 1987; LEIPOLD and STEFFEN, 1989; TESTONI and GENTILE, 2006; BUITKAMP et al., 2008, 2011).

TESTONI a GENTILE (2004) uvádí příklad čtyř mrtvých telat italské populace švýcarského hnědého skotu, u nichž byly shledány malformace lebky a zadních končetin. Obličejové deformity byly znatelné u všech zvířat, byly charakterizovány velmi krátkou spodní čelistí, přibližně 5–10 cm a horní čelistí konkávně zaoblenou v dorzálním profilu. Profil hlavy se podobal ohaří. Všechna telata vypadala „příkrčeně“, vlivem kyfózy, ohnutí páteře vpřed a skoliózy páteře. Jejich končetiny se zdály delší a tenčí než normálně a byly obloukovitě zakřivené, s úhlovými deformitami především zadních končetin. Úhlové deformity byly shledány v distální části zadních nohou, vyznačovaly se velkým obousměrným rozsahem pohybu spěnek, s extrémně vpřed směřujícími prsty a souběžně směřovaným trupem.

Tenké kosti nevznikají poruchou epifýzy dlouhých kostí, ale poruchou diafýzy, zvláště zápěstí a nártu. Křehkost dlouhých kostí byla doložena vícečetnými frakturami nohou u tří telat, možná v souvislosti s obtížným porodem, svaly nohou byly atrofovány. Rentgenový snímek nohou ukázal zakřivené diafýzy dlouhých kostí a řídkou dřev ovlivňující poškození kostí (TESTONI and GENTILE 2004; BUITKAMP et al., 2008).

Malformace srdce byly patrné u jednoho telete, bylo zde úplné přestavění arteriálního kmene a oboustranná soustředná ventrikulární hypertrofie (TESTONI and GENTILE, 2004). U postižených telat byla shledána mozková hernie kombinovaná s malformací lebečních kostí, vnitřní a vnější hydrocefalus (BUITKAMP et al., 2008).

Patogenese nemoci se dle literatury zdánlivě překrývá s Marfanovým syndromem, arachnodaktylií v humánní medicíně. Klinická zjištění zaznamenaná u arachnomelií postižených telat jsou obvykle odlišná od typického obrázku lidských „Marfanových pacientů“, arachnodaktylie se vyznačuje velkou křehkostí dlouhých kostí, defekty srdce, hlavních arterií

a jejich ektopií neboli změnou polohy. Dle autorů je nevhodné považovat tato dvě onemocnění za shodná. Lidský Marfanův syndrom nesnižuje životaschopnost pacientů, ale arachnomelia má u skotu letální charakter. Histologické zkoušky vybraných případů odhalily přítomnost krevních výronů v osteochondrálním přechodu epifýz a náhlý přechod z chondrální do kostní tkáně (TESTONI and GENTILE, 2006).

### **Detekce genetické příčiny AS**

U švýcarského hnědého plemene je předpokládán autozomálně recesivní přenos a kontrolní program je založen na identifikaci nositelů syndromu, např. analýzou rodokmenů (KÖNIG et al., 1987). ROSSI et al. (2008) a DRÖGEMÜLLER et al. (2009) zjistili u italské populace švýcarského hnědého skotu dle analýzy rodokmenů postižených jedinců, že se jedná o autozomálně recesivní onemocnění. Studium genomu za pomoci mikrosatelitů a markerů zjistili, že gen způsobující arachnomelii je umístěn v chromozómu 5.

DRÖGEMÜLLER et al. (2010) zjistil, že genetickou příčinou koprespondující s fenotypem AS u švýcarského hnědého skotu může být poškození genu *SUOX* pro molybdo hemoprotein siřičitan oxidázu vlivem inserce 1 bp v exonu 4 (c.363–364insG). Důsledkem je posun čtecího rámce, kdy od 124. aminokyselinového zbytku dochází ke změně *SUOX* proteinové sekvence (p.Ala124GlyfsX42), změna se týká 42 aminokyselin, vlivem předčasného stop kodonu 75 % bílkoviny chybí. Je velmi nepravděpodobné, že mutantní protein může plnit některé fyziologické funkce. Tímto je narušena funkčnost enzymu molybdo hemoprotein siřičitan oxidázy, který má důležitou roli pro normální vývoj kostí. Molybdo hemoprotein siřičitan oxidáza je terminální enzym v dráze oxidační degradace sirných aminokyselin.

V současnosti je vyvinuta patentovaná metodika, která je schopna z krevní DNA prověřovaného zvířete a jeho matky na základě mikrosatelitních markerů identifikovat nositele onemocnění.

Další typ genetického založení pro fenotypový projev AS uvádí BUITKAMP et al. (2009) u německé populace simentálského plemene, identifikoval kandidátní pozici arachnomelia syndromu pomocí souboru regionálních mikrosatelitů v chromozómu 23. Také SEICHTER et al. (2011) umístil mutaci u plemene fleckvieh do stejné oblasti chromozómu 23 jako Buitkamp pro simentálské plemeno a JANSEN et al. (2013) u plemene fleckvieh.

BUITKAMP et al. (2011) dále upřesňuje své výsledky, objevil souvislost syndromu s delecí dvou bp v hovězím genu *MOCSI*, v exonu 11 (c.1224–1225delCA). Narušení translace s výše uvedeným proteinem lze dát do příčinné souvislosti s tímto specifickým fenotypovým projevem AS. Podle očekávání, všechna postižená telata byla homozygotní pro mutaci

(del/del), zatímco všichni rodiče byli heterozygotní (hm/del). U genu *MOCS1* byl u transkripce zaznamenán alternativní sestřih, výsledkem je MOCS 1B, MOCS 1A protein. Tyto proteiny se podílejí na prvním kroku syntézy molybdenového kofaktoru (Moco). Enzym siřičtan oxidáza vyžaduje pro svoji normální funkci molybdenový kofaktor.

Protein MOCS1 je potřebný pro syntézu molybdopterin kofaktoru, který tvoří aktivní místo v SUOX. Zapojení SUOX a MOCS1 do stejné biochemické dráhy vzájemně podporuje kauzalitu těchto mutací švýcarského hnědého skotu a německého strakatého skotu (DRÖGEMÜLLER et al., 2010).

Tyto rozdílné výsledky u některých plemen skotu naznačují pravděpodobnou možnost genetické různorodosti onemocnění. Arachnomelia je prvním zjištěným oligogenním onemocněním skotu (BUIKAMP et al., 2011).

### **Výskyt onemocnění AS**

Onemocnění poprvé popsal RIECK and SCHADE (1975) u holštýnského, červeného holštýnského skotu, rovněž bylo zjištěno u italské populace švýcarského hnědého skotu, simentálského skotu v Rakousku a Německu (TESTONI and GENTILE, 2006; BUIKAMP et al., 2008). SEICHTER et al. (2011) a JANSEN et al. (2013) uvádí toto postižení u plemene fleckvieh. Studium rodokmenů postižených jedinců švýcarského hnědého plemene byl zjištěn býk narozený v r. 1957, první nositel této mutace (DRÖGEMÜLLER et al., 2010).

V populaci švýcarského hnědého skotu se objevily stovky případů během roku 1980, zvýšený výskyt případů souvisí s uplatněním některých plemenů v inseminaci (KÖNIG et al., 1987).

Americký plemník švýcarského hnědého skotu Norvic Lilasons Beautician US 138750.6, narozen 1960 a především Prealba Pete Rose AMARANTO IT 106 342.7, narozen 1995 (DRÖGEMÜLLER et al., 2009), byli zdrojem šíření tohoto defektu u evropské populace švýcarského hnědého skotu v 80. a pozdějších letech (KÖNIG et al., 1987; TESTONI and GENTILE, 2006).

Při výzkumu rakouské populace švýcarského hnědého skotu byla zvířata rozdělena do skupin dle roku narození počínaje rokem 1968. Bylo kontrolováno 295 592 zvířat, 6 generací rodokmenů známých nositelů letálních genů. Frekvence výskytu letálního genu arachnomelie dosáhla maxima 2,34 % u krav s rokem narození 1983 a pokles výskytu 1,71 % nastal u krav narozených v roce 1988. Maximální genová frekvence u býků byla dosažena v roce 1981, a to 3,01 %, dále postupně klesala na 2,17 % (LIDAUER et al., 1994).

BUITKAMP et al. (2008) sledoval výskyt syndromu u německé a rakouské populace simentálského skotu. V letech 2005–2007 detekoval celkem 152 telat postižených syndromem arachnomelie. Nejvíce případů postižení u telat (126) tohoto plemene bylo zaznamenáno v roce 2006, kdy byli v oblibě někteří býci – skrytí nositelé postižení (Romel – 1995, Egel – 1985, Rexon – 1989).

BUITKAMP et al. (2011) genotypizací části bavorské populace simentálského skotu zjistil 2,8 % heterozygotních skrytých nositelů nově detekované delece genu *MOCSI*. Tato mutace nebyla pozorována u náhodně vybraných 120 kusů skotu jiných plemen, německý gelbvieh, holštýnsko-fríské, belgické modrobílé a braunvieh. Na základě genotypizací DNA a z analýz rodokmenů heterozygotních nositelů postižení u simentálského skotu byl zjištěn hlavní šířitel mutace býk Semper, prvním nositelem mutace onemocnění byl pravděpodobně jeho otec Senat.

#### **2.4.9 Syndaktylie**

Mule foot disease – MFD; Syndactyly – SY; gen skotu: low density lipoprotein receptor – related protein 4 – *LRP4*; chromozóm 15; lokace 15q27; NCBI kód genu: 504317

##### **Symptomy postižení SY**

Syndaktylie u skotu je dědičné autozomálně recesivní onemocnění s variabilitou u jednotlivých plemen. Defekt se projevuje srůstem prstů na jedné nebo více končetinách (DRÖGEMÜLLER et al., 2007).

Hlavním rysem dědičné syndaktilie, je splynutí neboli nečlenění prstů. Porucha je hlavně osteologická a spočívá v kostním spojení prstů. Zejména metakarpální a metatarsální III. a IV. kosti vykazují u syndaktilních plodů předčasné splynutí. Zajímavé je, že tyto srůsty kostí jsou doprovázeny zvýšeným rozvojem metakarpální a metatarsální II. a V. kosti, ukazující dobře vyvinuté základní prsty II. a V.. Pozdější symptomy jsou podobné polydaktylickému syndromu. Tyto anatomické defekty jsou doprovázeny náchylností k hypertermii vyvolané zvýšenou okolní teplotou (ELDRIDGE et al., 1951; LEIPOLD et al., 1969, 1974; HART et al., 1987).

##### **Detekce genetické příčiny SY**

U skotu se syndaktylie ukazuje jako samostatný autozomálně recesivní znak s neúplnou penetrancí. Příslušný lokus je uváděn jako SY, s dvěma alelami  $SY^+$  a sy. Vysoký výskyt



onemocnění sledovaný u holštýnů může být spojen s prvenstvím nositelů onemocnění ( $SY^+/sy$ ) pro produkci mléka a tuku v mléce ve srovnání s normální kontrolou ( $SY^+/SY^+$ ) (LEIPOLD et al., 1973).

Kandidátní region pro postižení syndaktilií se nachází na 15. bovinním chromozómu (CHARLIER et al., 1996). Nositelé této kombinace (heterozygoti  $SY^+/sy$ ) jsou mezinárodně označováni písmeny MF za svým jménem. Mutace genu není úplně letální, ale zcela zásadně omezuje život zvířete (ŠLEJTR, 2002). Možnost, že umělá selekce upřednostňující heterozygoty může přispívat k nepříjemnému zvýšení četnosti onemocnění, byla shledána díky údajům ukazujícím, že přenašečky onemocnění produkovaly v průměru o 2,1 liber mléčného tuku a 298 liber mléka více než homozygoti (LEIPOLD et al., 1973).

V poslední době byly popsány některé mutace u bovinního genu *LRP4*, jež byly shledány jako prvotní příčina syndaktylie u plemene holštýn, simentál, kříženců simentál – charolais (DUCHENSE et al., 2006; DRÖGEMÜLLER et al., 2007). *LRP4* náleží k rodině LDL (low density receptor) receptorů, která se skládá ze sedmi strukturně úzce souvisejících transmembránových proteinů. Tyto proteiny jsou zakotveny v plazmatické membráně (HERZ, 2001).

DUCHENSE et al. (2006) identifikoval CpG/ApT netradiční substituci v exonu 33 (c.4863C>A; c.4864G>T) v bovinním *LRP 4* genu, jejímž výsledkem je změna aminokyseliny v proteinu (p.asn1621lys; p.gly1622cys).

JOHNSON et al. (2006) popsal odlišnou mutaci u stejného genu, u skotu plemene aberdeen-angus, MFD oblast je úzký interval na bovinním chromozómu 15, je syntenický lidskému chromozómu 11p12–p11.2. Tato oblast obsahuje *MEGF7/LRP4* (schválený genetický symbol *LRP4*). Gen, který kóduje součást multifunkčního lipoproteinového receptoru. *MEGF7/LRP4* je silný kandidát pro MFD mutaci. Užitím PCR analýzy vzorků tkáně a spermatu z potvrzených homozygotních MFD nositelů, byla identifikována jednoduchá funkční mutace báze páru u postižených zvířat. Bylo prokázáno, že změna (c.5385G>A) na prvním nukleotidu na stykovém donorovém místě intronu 37 úplně vyřadí toto stykové místo. Abnormální spojování je způsobeno touto mutací a predikuje tvorbu dysfunkčního membránového receptoru chybějící normální cytoplazmatické oblasti.

DRÖGEMÜLLER et al. (2007) uvádí další čtyři mutace se vztahem k proteinu 4 genu *LRP4*. Např. u postiženého homozygotního německého holštýnského telete byla v tomto genu exonu 33 na pozici 103 nalezena bodová mutace (c.4940C>T), která byla identifikována rovněž u heterozygotních rodičů. Tato mutace je příčinou změny aminokyseliny (p.pro1647lys). Další dvě nově autorem popsané bodové mutace způsobující onemocnění v homozygotním

uspořádání, se vyskytly u německého simentálského telete. První byla nalezena v exonu 3 na pozici 42 (c.241G>A) způsobila změnu v aminokyselinách (p.gly81ser). Druhá byla nalezena v exonu 26 na pozici 59, bodová mutace (c.3595G>A) způsobila změnu v aminokyselinách (p.gly1199ser). U kříženců (simentál x charolais) byla zjištěna bodová mutace (c.2719G>A) v exonu 20. Došlo k záměně aminokyselin (p.gly907arg). Tato mutace byla pozorována v souvislosti s již v textu popsanou mutací v exonu 33.

### **Výskyt onemocnění SY**

Postižení skotu bylo popsáno např. u plemene holštýn (nejvyšší výskyt u amerických holštýnů), aberdeen-angus, německý simentál, kříženci simentál-charolais, brown swiss, chianina, hariana (CHARLIER at al., 1996; DRÖGEMÜLLER et al., 2007; LEIPOLD et al., 1973; DUCHENSE et al., 2006; JOHNSON et al., 2006).

Za prvního významného nositele je považován býk Wayne-Spring Fond Apollo MF. Tento býk byl velmi významným plemeníkem a jeho geny nalezneme i u spousty býků, kteří tento defekt nenesou (např. světoznámý Blackstar). Bohužel máme i významné býky, kteří po něm tento gen zdělili. Za nejznámější nositele lze považovat býky Bena, Sharka (NX 841), Tugola a Jaguara (NX 945) (ŠLEJTR, 2002).

Syndaktilie byla popsána nejen u skotu, ale rovněž u člověka, prasete, ovce, psa nebo i jelence viržinského (běloocasého) *Odocoileus virginianus* (BOSSE et al., 2000; LEIPOLD and DENNIS, 1972; DENNIS and LEIPOLD, 1970; RENOY and BALLIGAND, 1991).

### **2.4.10 Chediak–Higashi syndrom**

Chediak–Higashi syndrome – CHS; gen skotu: *CHSI/LYST*, chromozóm 28; lokace: 28q12; NCBI kód genu: 281072.

#### **Symptomy postižení CHS**

Výskyt a plemenné záznamy indikují autozomálně recesivní dědičnost nemoci u skotu (TU et al., 1996).

Chediak–Higashi syndrom (CHS) byl původně popsán u lidí. Chediak v roce 1952 popsal hematologickou charakteristiku tohoto onemocnění. Pacienti postižení CHS umírají nejčastěji v prvním desetiletí života, na infekce, krvácení nebo u nich dochází k rozvoji intenzivní fáze, která je charakterizována lymfoproliferačním syndromem

s lymfohistiocytickou infiltrací (CHEDIAK, 1952). HIGASHI (1954) našel uvnitř buněk nemocí postižených pacientů obří granule, obsahující peroxidázu.

LYST je cytosolový protein důležitý pro lysozomální biogenezi a je zapojený do třídění proteinů mezi endozomy, lysozomy a plazmatickou membránu, ovlivňuje i mikrotubuly (NAGLE et al., 1996; FAIGLE et al., 1998). Ztráta funkce genu *CHSI/LYST* ovlivňuje hematologické, imunologické a neurologické procesy (KAPLAN et al., 2008).

Diagnostika CHS u japonského skotu wagyu byla založena na klinických znacích, jako jsou zejména zvýšená krvácivost, zjištěná při rutinních chirurgických procedurách jako je kastrace, odrohování nebo tvorba spontánních podkožních hematomů. Histologickým projevem jsou charakteristické obří cytoplazmatické granule u eozinofilů, barveno dle Wrighta–Giemsy (YAMAKUCHI et al., 2000).

Syndrom Chediak–Higashi u plemene wagyu lze charakterizovat zvýšeným sklonem ke krvácení a nespecifickými granulami v leukocytech. Zjevný kožní albinismus byl zaznamenán u několika novorozených telat, ale ne u většiny postiženého skotu. Elektronovým mikroskopem bylo pozorováno znatelné snížení hustoty granulí v krevních destičkách. Funkce kolagenu indukující soudržnost destiček byla zřetelně snížena. Se zřetelem k náchylnosti k infekcím, albinismu a úmrtnosti, byly klinické projevy CHS u japonského černého skotu mírné ve srovnání s lidským CHS a herefordským skotem (OGAWA et al., 1997).

U všech druhů s CHS jsou zjišťovány podobné klinické projevy, oculocutaneous hypopigmentation, zvýšená predispozice ke krvácení a snížení odolnosti k infekcím. Hlavním histopatologickým charakteristickým znakem CHS u všech druhů jsou u různých typů buněk charakteristické obří cytoplazmatické granule. Tyto se mohou projevit i v izolovaných kulturách buněk nemocných jedinců (PENNER et al., 1987).

Krvácivost je způsobena neschopností krevních destiček se spojovat - shromažďovat, je výsledkem nízké odezvy kolagenu. Studium in vitro shromažďování krevních destiček pacientů s CHS odhalilo, že shromažďování je vyvoláno kolagenem, který je důležitým destičkovým aktivátorem tvorby trombů, když je poraněna cévní stěna. Byla popsána abnormalita u CHS destiček a možná příčina nedostatečnosti soudržnosti (shlukování). U CHS poškozených destiček bylo zjištěno poškození kolagenového receptoru  $Ca^{2+}$  signálního systému (SHIRAISHI et al., 2002). V normálním stavu krevní destičky nejsou lepivé k cévní stěně. Když je cévní stěna porušena, destičky se lepí k subendoteliální extracelulární matici (ECM) a začnou být aktivovány. Kolagen je bohatě zastoupen v ECM v cévní stěně. Nastává složitý proces s mnoha vzájemnými interakcemi.  $Ca^{2+}$  je důležitý intracelulární posílčec mnoha buněk (BERRIDGE,

1993). Předpokládá se, že mechanismus připojování destiček ke kolagenu a role každého kolagen receptoru je mezidruhově dosti odlišná (KAWASHIMA, 2001; SHIRAISHI et al., 2002).

### **Detekce genetické příčiny CHS**

Přesvědčivým výsledkem byla identifikace příčinných mutací v genu lysozomálního přenosového regulátoru *CHSI/LYST* u myši (PEROU et al., 1996) a člověka (NAGLE et al., 1996).

Analýzou bylo odhaleno důležité spojení mezi *CHS* lokusem a markerem lokusu na proximálním konci bovinního chromozomu 28. Lokus *CHS* byl mapován v oblasti začleňující mikrosatelitové markery BMC 6020, BM2892 a RM 016 (KUNIEDA et al., 2000). Bovinní gen *CHSI/LYST* byl charakterizován jako homologní genu, zodpovědnému za humánní Chediak–Higashi syndrom. Mutace na *CHSI/LYST* genu je pravděpodobně zodpovědná za Chediak–Higashi syndrom u černého japonského skotu (KUNIEDA et al., 2000).

Oblast bovinního *LYST* cDNA má 11562 bp kóduje 3706 aminokyselin. Porovnáním nukleotidových sekvencí bovinního *LYST* genu (*LYST* cDNA) mezi normálním a postiženým skotem byla zjištěna pro onemocnění specifická 1 bázová nukleotidová substituce (c.6065 A>G), která způsobila, že aminokyselina histidin byla nahrazena argininem na kodonu 2015 (KUNIEDA et al., 1999).

PCR-RFLP analýza bovinního *LYST* genu: 108 bp fragment obsahující kodon 2015 byl amplifikován z genomové DNA skotu primerovým párem a vystaven působení *FokI* endonukleázy. Amplifikované fragmenty zdravého skotu (homozygoti dominantní) měly po štěpení *FokI* velikost (42b p a 66 bp), zatímco postižený skot (homozygoti recesivní) zůstal po působení *FokI* nerozštěpen (108 bp). Nositelé CHS (heterozygoti) měli fragmenty 108 bp, 66 bp a 42 bp. Cílová sekvence pro *FokI* (CATCC) je přítomna u zdravého zvířete, postižené zvíře (CGTCC) sekvenci nemá (KUNIEDA et al., 1999).

### **Výskyt onemocnění CHS**

Chediak–Higashi syndrom byl popsán u několika druhů savců, člověka, kočky, skotu, norka, myši, krysy a lišky (CHEDIAK, 1952; COLLIER et al., 1984; NAGLE et al., 1996; PEROU et al., 1996; SHIRAISHI et al., 2002).

U skotu bylo onemocnění popsáno u plemene wagyu – japonského černého skotu (OGAWA et al., 1997), plemene hereford (BURNS et al., 1984), brangus (AYERS et al., 1988).

### 2.4.11 Leucinóza - nemoc javorového sirupu

Branched chain ketoaciduria; Maple syrup urine disease – MSUD;

gen skotu: *BCKDHA* – branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide, chromozóm 18; NCBI kód genu: 282149.

nebo gen skotu: *BCKDHB* – branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide, chromozóm: 9; NCBI kód genu: 282150.

#### Symptomy postižení MSUD

MSUD je onemocnění způsobené nedostatkem aktivity mitochondriálního enzymu BCKADH (branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase) (DANNER and ELSAS, 1989). Tento deficit způsobuje, že v krvi a tkáních je zjištěna zvýšená koncentrace větvených řetězců aminokyselin BCAA (branched chain amino acids) a jejich příslušných ketokyselin (BCKA – branched chain  $\alpha$ -keto acid) (HARPER et al., 1986b).

U skotu je MSUD charakterizován časným začátkem vzrůstajícího neurologického onemocnění, vedoucího ke smrti během prvního týdne života (DANNER and ELSAS, 1989). Telata jsou postižena v prvním týdnu života vážnými neurologickými příznaky. Typickými jsou otupělost, slabost, následné polehávání 2. až 4. den věku, křeče ležícího zvířete, končící smrtí (HARPER et al., 1986b). Moč postižených telat má hořkosladký jemný pach připáleného cukru – karamelu a je pozitivně testovaná na ketokyseliny DNPH (2,4-dinitrofenyl hydrazinovým) testem (DANCIS and LEVITZ, 1978). U bovinní MSUD se centrální nervový systém projevuje poklesem  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny, která zprostředkovává přenos inhibitoru (DODD et al., 1992). Bylo zjištěno vážné poškození CNS. Intramyelinové vakuolové útvary způsobují trhliny v myelinových pouzdrech v polovině linie. Myelinový edém se histologicky projevuje tvorbou dutinek v bílé hmotě mozečku (HARPER et al., 1986b). Vážný „spongiosní stav“ CNS u telat je termín aplikovaný na nervovou tkáň. Zjištěné léze se vyznačují formacemi velkých vakuol, hlavně v myelinové bílé hmotě v oblasti mozečku, mozkové kůry a míst myelinových koncových vláken, včetně jader mozkového kmene a pátevní šedé hmoty (HARPER et al., 1989). Patogeneze těchto lézí je neurčitá, ale může být důsledkem zvýšené koncentrace ketoisokapronové kyseliny, jedné ze složek rozvětveného řetězce BCKADH – mitochondriálního enzymu, jehož nedostatek je příčinou onemocnění (DANNER a ELSAS, 1989).

V krvi a tkáních byla zjištěna zvýšená koncentrace větvených aminokyselin BCAA (branched chain amino acids), leucinu, isoleucinu, valinu a jejich příslušných ketokyselin

BCKA, ketoisokapronové kyseliny, keto- $\beta$ -methylvalerové kyseliny a ketoisovalerové kyseliny (HARPER et al., 1986b).

### Detekce genetické příčiny MSUD

BCKADH tvoří čtyři podjednotky E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2 a E3, každá je kódována samostatným genem. Mutace v některé ze čtyř podjednotek BCKADH může mít za následek MSUD (DANNER and ELSAS, 1989). Výsledky genotypizace ukazují molekulární různorodost pro MSUD telat některých plemen (DENNIS AND HEALLY, 1999).

U bezrohého hereforda (PH) je MSUD zapříčiněn předčasným ukončením translace podjednotky E1 $\alpha$ , to je indukováno substitucí (c.248C>T) v exonu 2. Je to jednoduchá bázová substituce, kdy CAG kódující glutamin v hlavním peptidu (kodón 6) je mutován na TAG – stop kodón, jejímž výsledkem je inaktivace zkrácených polypeptidů (ZHANG et al., 1990). U postižených bezrohých herefordských telat postrádá E1 $\alpha$  aktivitu, což je výsledek předčasného ukončení translace způsobené terminačním kodónem. Mutanti jsou homozygoti (DENNIS AND HEALLY, 1999).

U bezrohého shorthorna (PS) je MSUD zapříčiněn bodovou mutací (c.1380C>T) v exonu 9. Mutace je příčinou nahrazení prolinu leucinem v kodónu 372 (DENNIS AND HEALLY, 1999). U postižených bezrohých shorthornských telat postrádá E1 $\alpha$  aktivitu, protože 1380 T mění kodón, což má za následek rozvrácení stálých oblastí v bílkovině.

U kříženců z PS x PH je otcovský E1 $\alpha$  zděděný od PS, kříženci mají 1380 T alelu, proto je 50 % jejich E1 $\alpha$  genových produktů defektních. Od PH matek kříženci zdědí 248 T alelu, translace z maternální E1 $\alpha$  byla předčasně ukončena. Telata kříženci, mají E1 $\alpha$  s nedostatečnou aktivitou a s následným rozvojem MSUD, tvoří heterozygoty ve dvou místech uvnitř E1 $\alpha$  genu, s haplotypem 248 T/C a 1380 C/T (DENNIS AND HEALLY, 1999).

Dle DENNIS AND HEALLY (1999) bylo užito několik primerů k RT a PCR pro určení cDNA a genomickou sekvenací E1 $\alpha$ . Náhradou G za A na 22.bp u primeru č. 242 se vytvořilo *BanI* (GGTGCC) restrikční místo pro wildtypový amplikon, to je však odstraněno tranzicí (c.1380C>T).

Genotypizace (c.1380C>T) dle DENNIS AND HEALLY (1999). Byl amplifikován PCR 219 bp fragment z exonu 9. Primer č. 242 zahrnuje *BanI* restrikční místo z 5' konce pro wildtypový amplikon, ale u mutantního toto místo není. *BanI* odštěpuje 21 bp fragment z 5' konce wildtypového amplikonu a 27 bp fragment z 3' konce obou wildtypů a mutantních amplikonů. Jen 192 bp fragment je u PS postižených telat. Fragmenty 192 bp a 171 bp jsou u postižených

telat kříženců a u PS rodičů postižených telat. Pouze 171 bp fragment byl nalezen u PH a ostatních plemen.

Genotypizace (c.248C>T) dle DENNIS AND HEALLY (1999). Byl amplifikován 94 bp fragment exonu 2 včetně CAG z intronu 1. Primer č. 270 zahrnuje *BglI* restrikční místo v 5' konci u wildtypového amplikonu, ale ne u mutantního amplikonu. *BglI* odštěpuje z wildtypových amplikonů 15 bp a 79 bp fragment, je u všech PS a jiných plemen. Neštěpený 94 bp fragment náleží PH postiženým telatům. Oba fragmenty 79 bp a 94 bp jsou u postižených kříženců a PH heterozygotů rodičů postižených telat.

### **Výskyt onemocnění MSUD**

Onemocnění bylo zaznamenáno u bezrohého hereforda v Austrálii a Kanadě (HARPER et al., 1986b,1989; BAIRD et. al., 1987), bezrohého shorthornského skotu (HEALY et al., 1992), kříženců bezrohého hereforda a bezrohého shorthornského skotu (DENNIS AND HEALLY, 1999), rovněž u amerických kříženců gelbvieh – red angus (O'TOOLE et al., 2005). HEALY and DENNIS (1995) zjistil během roku 1993 12 heterozygotů z 203 býků mezi bezrohými herefordy v Austrálii.

### **2.4.12 Protoporfyrie**

Protoporphyria – PP; gen skotu: Ferrochelatase; *FECH*; chromozóm 24; NCBI kód genu: 281158.

#### **Symptomy postižení PP**

Protoporfyrie je defekt ferochelatázy (FC) neboli krevní syntetázy, což je mitochondriální enzym, který katalyzuje chelatonové železo od protoporfyrinu na formu hemu (BONKOWSKY et al., 1975). U člověka jde o genetické onemocnění metabolismu porfyrinu, který je nadměrně ukládán a vyměšován jako protoporfyrin, výsledkem je zvýšení hladin této složky v erytrocytech, plazmě a stolici (MAGNUS et al., 1961; HAEGER et al., 1963).

SCHELCHER et al. (1991) popisuje případ tří čtyřměsíčních telat plemene blonde d'Aquitaine, kdy byly zjištěny kožní léze již po narození vlivem fotosenzitivity. Jejich porfyrinový metabolismus indikoval znaky snížené aktivity lymfocytické ferochelatázy, vedoucí k diagnóze kongenitální erytrocytické protoporfyrie.

Lidská a bovinní protoporfyrie jsou charakterizovány fotosenzitivitou a zvýšením hladin erytrocytárního a fekálního protoporfyrinu (BRENNER and BLOOMER, 1979). Protoporfyrie je případem ztráty aktivity ferochelátázy, která katalyzuje finální krok v krevní biosyntéze (JENKINS et al., 1998).

BLOOMER et al. (1987) zjistil, že mutantní enzym FC z jater postiženého skotu měl jen 10–15% katalytickou aktivitu ve srovnání s ferokatalázou zdravého zvířete. Hladiny aktivity krevní syntázy z jater rodičů postižených zvířat (heterozygotů) byla mezi hodnotami normálních zvířat a postižených zvířat protoporfyrií.

Protoporfyrin je poslední meziprodukt v kaskádě biosyntézy hemu z aminolevulátu (ALA) (LAYER et al., 2010). Přeměna protoporfyrinu na hem je katalyzována enzymem ferochelátázou. Protoporfyrie je onemocnění plynoucí z nahromadění protoporfyrinu, způsobené nedostatkem případně chyběním tohoto enzymu. Protoporfyrin je extrémně fotochemicky reaktivní. Fotosensitivita je hlavní klinický znak tohoto onemocnění (Bloomer et al., 1975).

U člověka vzniká protoporfyrie snížením FC v kostní dřeni, periferní krvi, jaterní tkáni a kožních fibroblastech. Onemocnění začíná v dětském věku, je charakterizováno fotosenzitivitou, která je závislá na hladině protoporfyrinu v erytrocytech. Po expozici UV zářením dochází k pálení a svědění kůže, zarudnutí a vzniku puchýřů. V laboratorním nálezu je zvýšená koncentrace protoporfyrinu v erytrocytech a plazmě, zvýšené vylučování protoporfyrinu stolicí. Jaterní onemocnění je charakterizováno přímou hyperbilirubinemií, středně zvýšenou aktivitou aminotransferáz a alkalické fosfatázy. U jaterního postižení dochází ke zvýšenému vylučování porfyrinů močí, zejména koproporfyrinu I (BLAU et al., 2003).

### **Detekce genetické příčiny onemocnění PP**

Protoporfyrie byla popsána nejen u člověka, ale i u skotu (RUTH et al., 1977). Bovinní protoporfyrie se liší od humánní protoporfyrie v dědičnosti. Bovinní má autozomálně recesivní typ dědičnosti (BLOOMER et al., 1982), lidská má autozomálně dominantní typ dědičnosti (HAEGER et al., 1963; DE LEO VA et al., 1976). Pro vyjádření fenotypu PP, jsou u skotu nezbytné dvě kopie mutagenního genu, zatímco jedna kopie je dostačující u člověka (JENKINS et al., 1998).

Bovinní ferochelátázový kód je z 86 % homologní s lidským (SHIBUYA et al., 1995).

Příčinou onemocnění je mutace v bovinním ferochelátázovém genu (SHIBUYA et al., 1995). Gen *FECH* se nachází na bovinním chromozómu 24 (NCBI, 2014). Kódovací oblast FC byla sekvenována z jaterní tkáně protoporfyrického a normálního skotu. Změna byla



identifikována u nukleotidové pozice 1250 se záměnou stop kodonu TGA na leucin TTA (p.X417leu) v protoporfyrické FC sekvenci. Následkem je mutovaný protein mající navíc 27 aminokyselin. K vyšetření dalšího skotu na přeměnu (c.1250G>T), cDNA z jaterní tkáň klinicky a biochemicky normálních, heterozygotních a homozygotních postižených zvířat bylo užito alelicky specifické PCR. Tři normální zvířata měla jen G alely, pět postižených zvířat mělo jen T alelu a tři heterozygotní zvířata měla obě G a T alelu. Tyto výsledky podporují hypotézu, že tato mutace je příčinou PP u skotu (JENKINS et al., 1998).

### **Výskyt onemocnění PP**

Protoporfyririe byla popsána u člověka i skotu (RUTH et al., 1977). U skotu byla zaznamenána např. u plemene blonde d'aquitaine (SCHELCHER et al., 1991), limousine (BUCHANAN et al., 1995). SHIOZAWA et al. (1995) popisuje dva případy protoporfyririe u kuřic brojlerových kuřat.

### **2.4.13 Alfa-manosidóza;**

Mannosidosis alpha; gen skotu: Mannosidase, alpha, class 2B, member 1; *MAN2B1*; chromozóm 7; NCBI kód genu: 282272.

### **Symptomy postižení alfa-manosidózou**

Alfa-manosidóza je lysozomálně akumulární onemocnění s autozomálně recesivní dědičností, při němž jsou kumulovány manózou bohaté sloučeniny. Onemocnění je způsobeno deficitem alfa-manosidázy, jejímž úkolem je oddělit manózu z těchto sloučenin (WHITTEM and WALKER, 1957; CHESTER et al., 1982). Dědičné onemocnění je charakterizováno masivní akumulací nedegradovaných oligosacharidů s výslednými rozmanitými neurologickými, kosterními a imunitními defekty a zvětšením lysozomů ve většině typů buněk. Je zjišťováno zvýšení hladiny oligosacharidů v moči a fibroblastech (SUN et al., 2001). Vlivem onemocnění dochází k potratům mláďat. Většině postižených mláďat skotu se nepodaří přežít poporodní období, projevuje se u nich postupující neurologické postižení charakterizované ataxií, třesem hlavy, agresivitou a smrtí (HEALY et al., 1990 b; BORLAND et al., 1984). Postižení homozygoti skotu mají redukovanou úroveň MANB aktivity (WHITTEM and WALKER, 1957).

Onemocnění s rovněž autozomálně recesivní dědičností se vyskytuje u člověka (ÖCKERMAN, 1967). U člověka jsou dva fenotypové typy onemocnění infantilní (typ I)

a mladistvě-dospělý (typ II). U typu I prakticky všichni pacienti trpí psychomotorickou retardací, zhrubnutí obličeje a některým typem poškození kloubů a kostí. Častými klinickými nálezy jsou opakující se bakteriální infekce, hluchota, zvětšení jater a neprůhlednost čočky a rohovky. U závažnějších typů dochází ke zhoršení mentálních schopností. Pacienti často umírají před 12. rokem věku. U mírnějšího typu II dochází k přibližně normálnímu vývoji pacienta, s postupnou mentální retardací (THOMAS and BEAUDET, 1995).

### **Detekce genetické příčiny onemocnění alfa-manosidózy**

TOLLERSRUD et al. (1997) identifikoval dvě příčiny způsobující aminokyselinovou substituci u plemen skotu angus a galloway. BERG et al. (1997) identifikoval příčinu tohoto onemocnění u dalších plemen. U plemene galloway je za onemocnění zodpovědná mutační změna tranzice (c.662G>A). U plemene angus, murray grey a brangus v Austrálii a red angus z Kanady je to mutační změna tranzice (c.961T>C).

Genotypové testy jsou zpracovány (BERG et al., 1997; HEALY and MALMO, 1998). TOLLERSRUD et al. (1997) popisuje příslušný bovinní gen o délce 16 kb a zahrnuje 24 exonů. 2997 bází kóduje 50 aminokyselin signálního peptidu a dalších 949 aminokyselin, které tvoří 5 peptidů ve zralém enzymu. U plemene skotu angus substituce (c.961T>C) má za následek záměnu (p.phe321leu). U gallowayského skotu substituce (c.662G>A) má za následek záměnu aminokyselin (p.arg 221his).

### **Výskyt onemocnění alfa-manosidózy**

U skotu bylo popsáno u plemene aberdeen angus (WHITTEM and WALKER, 1957) a galloway (TOLLERSRUD et al., 1997), murray grey, brangus, red angus (BERG et al., 1997). Onemocnění bylo popsáno u angusského skotu v Evropě, USA a gallowayského skotu v Austrálii (HEALY et al., 1990b; BORLAND et al., 1984). Onemocnění bylo detekováno u člověka (ÖCKERMAN, 1967), rovněž např. u koček (BURDITT et al., 1980) a guinejských prasat (*Cavia porcellus*) (CRAWLEY et al., 1999).

#### **2.4.14 Beta-manosidóza;**

Mannosidosis beta; gen skotu: Mannosidase beta A, lysosomal precursor; *MANBA*; chromozóm 6; lokace 6q3; NCBI kód genu: 281909

##### **Symptomy postižení $\beta$ -manosidózou**

Deficit  $\beta$ -manosidázové aktivity je výsledkem autozomálně recesivního dědičného onemocnění  $\beta$ -manosidózy. Lysozomální  $\beta$ -manosidáza je exoglykosidáza, která štěpí jednotlivé  $\beta$ -spojené manosové zbytky z neredukujícího konce všech N-spojení glykoproteinových oligosacharidů (HARTLEY and BLAKEMORE, 1973).

Onemocnění bylo poprvé zjištěno u nubijských koz (HARTLEY and BLAKEMORE, 1973), dále u skotu (LEIPPRANDT et al., 1999) a člověka (WENGER et al., 1986). Postižené kozy a skot mají velmi podobné klinické znaky, které zahrnují neschopnost po porodu vstát, lícní změny, třes a velmi zvětšený spěnkový kloub. U postižených telat byly zjištěny výrazně zvětšené ledviny, snížené množství bílé hmoty ve všech oblastech mozku a cytoplazmatická vakuolizace v buňkách nervové tkáně, ledvin, lymfatické tkáně a štítné žlázy (BRYAN et al., 1990).

Hluchota je shledávána u postižených koz, ale není u novorozených telat. Postižená kůzlata obvykle uhynou v období po narození, jestliže není prováděna intenzivní péče. U postižených zvířat je difúzně rozšířená cytoplazmatická vakuolizace a dysmyelinace, v centrálním nervovém systému jsou charakteristické léze (LOVELL and JONES, 1983).

Postižené kozy a telata jsou hypothyroidní, možno počítat s hypomyelinací CNS. (BOYER et al., 1990; LOVELL et al., 1991). Postižení přežvýkavci vykazují závažný deficit  $\beta$ -manosidázové aktivity v plazmě a různých tkáních (JONES and DAWSON, 1981). Primární kumulované produkty doprovázející enzymový deficit jsou trisacharidy a menší množství disacharidů (JONES et al., 1992).

Na rozdíl od ruminantní  $\beta$ -manosidózy, humánní případy mají lehčí klinický projev a mají značně různorodé vyjádření. Klinický projev zahrnuje mírné periferní neuropatie a deprese (LEVADE, 1994), malformace, mentální retardaci a řečové a sluchové defekty (KLEIJER et al, 1990). U humánní  $\beta$ -manosidózy je primárním akumulacním produktem disacharid (VAN PELT et al., 1990).

##### **Detekce genetické příčiny onemocnění $\beta$ -manosidózy**

SCHMUTZ et al. (1996) identifikoval pozici genu beta-manosidázy do bovinního chromozómu 6. Příčina onemocnění byla identifikována sekvenční analýzou cDNA nemocných

telat. Transiční mutace (c.2574G>A) u cDNA kódující sekvence, vytváří stop kodon blízko 3' konce protein kódující oblasti (LEIPPRANDT et al., 1999). Pro pomoc komerčním chovatelům salerského skotu byl vyvinut PCR test (LEIPPRANDT et al., 1999). Později byla vyvinuta další varianta testu (US Patent 5837836) (FRIDERICI et al., 1998). Bovinním  $\beta$ -manosidózovým testem můžeme rychle determinovat  $\beta$ -manosidózové přenašeče, z krve nebo vzorků tkáně, užitím techniky známé jako AIRS (artificial introduction of restriction sites). To zahrnuje PCR amplifikaci segmentu 187 bázových párů genomové DNA okolo místa bodové mutace, výběrově vytvářející *Bst*MI restriční místo v normálním amplikonu a opouštějící amplikon bez takového místa. Toto restriční místo, které není prezentováno u normální cDNA sekvence, bylo vytvořeno v normálním amplikonu s úmyslnou jednoduchou bází v PCR významném primeru. Jedna báze změnila umístění u normální sekvenční formy *Bst*MI restriční místo. Zdravá zvířata mají fragmenty 125, 43 a 19 bp, zvířata heterozygotní přenašeči, kteří mají jednu kopii normálního genu a jednu kopii mutovaného genu, DNA fragmenty jsou 144, 125, 43 a 19 bp. Diagnosticky platná je přítomnost nebo nepřítomnost 144 bp fragmentu.

### **Výskyt onemocnění beta-manosidózy**

Bovinní  $\beta$ -manosidóza se stala významným problémem u salerského plemene skotu a u kříženců se salerským plemenem (BRYAN et al., 1990). V Severní Americe se odhaduje množství přenašečů na 20–40 % (FRIDERICI et al., 1998).

Onemocnění bylo zjištěno u nubijských koz (HARTLEY and BLAKEMORE, 1973), u skotu (LEIPPRANDT et al., 1999) a člověka (WENGER et al., 1986).

## **2.5 Vybrané metody využívané pro genotypizaci sledovaných lokusů**

### **2.5.1 PCR - polymerase chain reaction**

Od roku 1985, kdy Kary Mullis vyvinul metodu polymerázové řetězové reakce (PCR), existuje dnes velké množství jejích variant a modifikací. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou standardní PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA – termostabilní polymerázy. U standardní PCR je studovaný úsek nukleotidové sekvence vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA – polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. Syntéza DNA probíhá opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v reakční směsi střídají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu: denaturace dvouřetězcových molekul DNA, připojení primerů k odděleným řetězcům DNA a syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA – polymerázy. Reakce probíhají v zařízení – termocykleru, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech, postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliardy kopií vybraného úseku cílové molekuly. Výsledným produktem PCR jsou amplikony, úseky DNA definované délkou o velikosti desítek až tisíce bp. Jejich přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou (ELFO) např. v agarózovém gelu (ŠMARDA et al., 2008).

Agarózový gel je například obarven ethidium bromidem, ELFO probíhá v TBE pufru po dobu několika desítek minut. Velikost je měřena pomocí komerčně vyráběného velikostního markeru. K vizualizaci amplifikátů dochází pod UV transiluminátorem.

### **2.5.2 PCR-RFLP**

Restrikční analýza PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) je modifikací standardní PCR používané pro typizaci obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. Amplifikované PCR produkty jsou štěpeny

specifickými restrikcčními endonukleázami II. typu (RE). Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce označované jako restrikcční fragmenty (ŠMARDÁ et al., 2008).

Jejich přítomnost se v reakční směsi prokazuje genotypizací jejich velikosti elektroforézou např. v agarózovém gelu v TBE pufru, podobně jako u PCR. Velikost je měřena pomocí komerčně vyráběného velikostního markeru a produktu PCR. Metoda PCR-RFLP je spolehlivá metoda pro detekci jednotlivých nukleotidových mutací a genetického polymorfismu.

### 2.5.3 AS-PCR

Systém pro detekci bodových mutací v genomech je nazýván alelově specifická amplifikace, AS-PCR (allele specific polymerase chain reaction). Metoda je prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích. V první reakci je jeden primer komplementární ke standardní sekvenci a v další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci. Druhý primer je v obou reakcích stejný. Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární. V případě homozygotního stavu bude k amplifikaci docházet pouze v jedné z reakcí (ŠMARDÁ et al., 2008).

Použití dvou primerů forward a jednoho reverzního (GHANEM et al., 2008). Primer forward wild typ (FW), primer forward mutant typ (FM), společný primer reverzní (R). Společný reverzní primer je použit zvlášť, jak s forward primerem wild typu, tak i mutant typem. Pro každé zvíře jsou tak prováděny 2 vzorky s dvojicí primerů FW/R a FM/R. Metoda byla posána nezávisle pod různými označeními a využívá dva odlišné přístupy. První výše uvedený přístup je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'- konci primeru.

Dle druhého přístupu dochází k chybnému párování bází ve střední části sekvence primeru a brání tak hybridizaci primeru k cílovému místu v případě, že se v templátové DNA vyskytuje. Pro snazší odlišení heterozygotního stavu v jediné reakci je používána varianta, kdy jeden z alelově-specifických primerů obsahuje na 5'- konci – přídatný úsek několika nekomplementárních nukleotidů, a tak mohou být amplifikační produkty obou alel rozlišeny na základě své délky. Metoda je obecně velmi citlivá na optimalizaci experimentálních podmínek reakce. Úspěšně se používá pro rozlišení homozygotního a heterozygotního stavu v klinických aplikacích (ŠMARDÁ et al., 2008).

## 2.5.4 PCR-PIRA

Metoda PCR-PIRA, polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis, je metoda, která může být použita pro detekci mutace jediného nukleotidu v každém genu bez přítomnosti restrikčního místa v okolí místa mutace, například pro detekci CVM alel (KANAE et al., 2005). Dle zdroje jsou primery navrženy tak, aby zavedly *Pst*I nebo *Eco*T22I restrikční místa do PCR wildtypových produktů a CVM alel. Wildtypová alela, heterozygot a homozygot z CVM alel mohou být následně rozlišeny analýzou polymorfismu délek restrikčních fragmentů.

## 3. Cíle práce

### 3.1 Genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v České republice

Cílem práce je genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v České republice, jejichž existence je převážně zapříčiněna některým z typů genových bodových mutací.

Pozornost bude věnována zejména významným monogenním autozomálně recesivním dědičným onemocněním: CVM (complex vertebral malformation), BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency), citrulinémií (citrullinaemia, argininosuccinate synthetase deficiency), DUMPS (deficiency of uridine monophosphate synthase), deficitu krevního faktoru XI (factor XI deficiency), GSD II (glycogen storage disease), GSD V (glycogen storage disease).

Genotyp zvířat bude zjišťován na genové úrovni s použitím metod molekulární biologie. Výskyt zejména heterozygotních skrytých přenašečů v populaci bude prověřován zejména u holštýnského skotu, dále českého strakatého skotu a vybraných plemen masného skotu, chovaných v ČR.

## **3.2 Molekulárně genetická analýza DNA v lokusu *ITGB2(CD18)* skotu**

Práce zahrnuje i molekulárně genetickou analýzu DNA v lokusu *ITGB2(CD18)* skotu. Detekce polymorfismů DNA v části lokusu *CD18* chromozómu 1, metodou PCR-RFLP u holštýnských krav se statusem TL vybranými restrikcními endonukleázami třídy II. Porovnání dosažených výsledků PCR-RFLP a zjištěných polymorfismů v úseku lokusu *CD18* zvířat se statusem TL, včetně kontrolních TL holštýnských krav s výsledky holštýnských krav se statusem BL.

Dalším cílem je analýza tiché mutace c.775C>T bez fenotypové manifestace v lokusu *CD18* skotu holštýnského plemene, u zvířat se statusem TL a BL a u českého strakatého skotu, metodou PCR-RFLP.

### **Výzkum byl financován z těchto projektů:**

- QF 3012 – Dědičné poruchy zdraví skotu – řešitele prof. Ing. J. Čítka, CSc.
- MSM 6007665806 – věcného okruhu 3 – řešitele prof. Ing. V. Řehouta, CSc.

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1 Analýza výskytu vybraných monogenních defektů**

#### **4.1.1 Zvířata**

Na základě spolupráce se Svazem chovatelů holštýnského skotu, poskytly spolupracující šlechtitelské firmy Natural, Genoservis, CRV a některé další, vzorky inseminačních dávek mladých holštýnských plemenů jak odchovaných v ČR, tak dovezených, kteří v letech 2003–2004 vstupovali do testačního připařování. Rovněž byly získány vzorky krve býků českého strakatého skotu, býků masných plemen charolais,



limousine, masný simentál, blonde d'Aquitaine, belgické modrobílé, aberdeen angus a hereford, kteří byli na inseminačních stanicích plemenných býků (ISB) připravováni k zahájení testace. Rovněž do některých screeningů byly zapojeny zejména holštýnské elitní krávy, matky býků nebo dárkyně embryí a jalovice jako potencionální elitní plemenice. Jejich vzorky byly rovněž poskytnuty spolupracujícími šlechtitelskými firmami.

Při některých genotypizacích byly analyzovány i vzorky holštýnských plemeníků a plemenic z Německa. Vzorky poskytl prof. Lothar Panicke z Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN).

Zvířatům byly odebírány vzorky biologického materiálu, zejména periferní krve nebo inseminační dávky. Získávání vzorků probíhalo za spolupráce se spoluřešitelským týmem Státního veterinárního ústavu v Brně (SVÚ), později od r. 2006 tento tým spolupracovníků přešel pod Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně (VÚVeL). Izolace DNA a genotypizace byla provedena v laboratoři genetiky a molekulární biologie, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Výjimkou byly genotypizace na CVM, které byly zprostředkovány laboratoří ČMSCH.

#### **4.1.1.1 Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na BLAD, DUMPS, citrulinémii**

Celkem bylo vybráno pro genotypizaci lokusů na BLAD, DUMPS a citrulinémii 406 holštýnských býků, z nich bylo 224 mladých býků, kteří zahájili v roce 2003 a 2004 testační přípařování a 182 mladých býků z inseminačních stanic, kteří byli připravováni pro vstup do inseminačních programů. Z důvodu existence zkoumaných postižení u tohoto plemene byl pro genotypizaci vybrán největší podíl zvířat. Rovněž bylo v letech (2003–2007) analyzováno 161 elitních českých holštýnských plemenic.

Dále bylo k analýze vybráno 146 mladých býků českého strakatého skotu. Vzhledem k tomu, že i v populaci tohoto plemene je určitý podíl zušlecht'ujícího holštýnského plemene, nelze výskyt postižení zcela vyloučit.

Zároveň bylo genotypizováno 17 býků slovenského strakatého plemene, 3 býci holštýnského plemene používaní na Slovensku a 12 v Polsku.

Tyto skupiny byly doplněny menším počtem celkem 30 býků masných plemen, a to charolais 8, limousine 6, masný simentál 2, blonde d'Aquitaine 3, belgické modrobílé 9,

aberdeen angus 1 a hereford 1. Jedinci těchto masných plemen zde byli zařazeni z experimentálních důvodů, kdy je dobré zkoumat i relativně málo pravděpodobné možnosti výskytu postižení.

#### **4.1.1.2 Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na CVM**

V letech 2003–2007 byl postupně sestaven panel 161 holštýnských elitních krav a jalovic, matek nebo potencionálních matek býků, případně dárkyní embryí, pro genotypizaci lokusů na CVM (zároveň i na BLAD, DUMPS, citrulinémii). Zvířata byla vytipována na základě znalosti rodokmenů pro podezření z přenašečství onemocnění.

#### **4.1.1.3 Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na GSD V a GSD II**

Pro genotypizaci lokusu na GSD V bylo vybráno celkem 113 plemeníků jednoho kombinovaného a šesti masných plemen. Plemena byla zastoupena v tomto počtu: český strakatý skot kombinovaného užitkového typu (n = 62), plemeníků charolais (n = 34), belgické modrobílé (n = 6), limousine (n = 4), blonde d'Aquitaine (n = 4), masný simentál (n = 2), aberdeen angus (n = 1). Pro genotypizaci lokusů na GSD II byl použit stejný panel zvířat.

#### **4.1.1.4 Výběr zvířat pro genotypizaci lokusů na deficit krevního koagulačního faktoru XI**

Panel pro analýzu mutace v exonu 12 tvořilo 30 plemeníků holštýnského plemene a 30 plemeníků českého strakatého skotu, vstupujících do testačního připravení v letech 2003–2005. Současně bylo testováno 189 býků a 60 krav německého holštýnského plemene, tyto vzorky poskytl Leibniz-Institut FBN.

Genotypizace mutace v exonu 9 proběhla na panelu 40 českých plemeníků holštýnského plemene a 52 plemeníků českého strakatého skotu, vstupujících do programu inseminace v letech 2003–2005. Současně bylo testováno 60 býků německého holštýnského plemene.

## **4.1.2 Izolace DNA**

Pro izolace DNA z biologického materiálu, krve nebo spermatu skotu resp. inseminačních dávek, byly použity standardní laboratorní postupy nebo komerčně vyráběné soupravy, izolační kity NucleoSpin®Blood.

### **4.1.2.1 Izolace DNA z periferní krve (standardní postup)**

1. den, smíchá se 300  $\mu$ l dig. pufru (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS-dodecylsulfát sodný, 50 mM EDTA - kyselina ethylendiaminotetraoctová, pH 8,0) s 10  $\mu$ l proteinázy K (dále jen PK) (c = 100  $\mu$ g/ml). Do každé eppendorfky (1,5 ml) se odměří 310  $\mu$ l roztoku dig. pufru + PK, přidá se 100  $\mu$ l dobře promíchané plné krve, dá se 2 hodiny inkubovat při 50 °C a následuje inkubace přes noc při 37 °C.

2. den, přidá se 300  $\mu$ l 5M LiCl, důkladně se roztřepe nejméně 1 minutu, přidá se 600  $\mu$ l chloroformu a převrácením se promíchává 30 minut. Odstředí se 15 min./14000 rpm a supernatant se převede nových eppendorfek. DNA se sráží isopropanolem nebo absolutním ethanolem (zkumavka se alkoholem naplní), důkladně se protřepe (DNA se sráží ve formě vláček pozorovatelných pouhým okem). Centrifuguje se 5 min./14000 rpm, supernatant se odsaje a peleta se promyje cca 200  $\mu$ l 70% ethanolem. Ethanol se odsaje, zbytek se nechá cca 20 min. schnout. Peleta se resuspenduje přes noc ve 100–200  $\mu$ l TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5), množství pufru se řídí velikostí pelety.

### **4.1.2.2 Izolace DNA z periferní krve (lyzátová metoda)**

50  $\mu$ l krve + EDTA se smíchá s 500  $\mu$ l TE pufru, odstředí se při 14000 rpm, TE pufr se odsaje, převrství čerstvým TE pufr, důkladně se roztřepe peleta leukocytů a opět centrifuguje, opakuje se 3 krát do vyčištění. Čistá peleta se převrství v 1,5 ml eppendorfce 100  $\mu$ l lyzačního pufru s proteinázou K. Koncentrace proteinázy K v lyzačním pufru je 100  $\mu$ g/ml. Nechá se inkubovat při 54 °C přes noc, následně se opatrně promíchá špičkou a používá se v PCR.

Lyzační pufr: 20 ml Tris, 50 ml 1M KCl, 2,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 5 ml Tween 20 (detergent), doplnit do 100 ml H<sub>2</sub>O, před použitím se ředí 10 krát.

#### **4.1.2.3 Izolace DNA ze spermatu**

1. den, obsah pejetý se spermatem se resuspenduje v 1 ml PBS pufru a centrifuguje 6 min./10000 rpm, PBS se odsaje, nahradí čerstvým, opakuje se 4 krát do vyčištění. K sedimentu se přidá: 200 µl PBS, 800 µl roztoku 3 (0,6 g Tris, 2,9 g NaCl, 0,4 g NaOH, doplnit do 0,5 litru redestilovanou vodou), 16 µl merkaptoethanolu. Inkubuje se 30 min. na vodní lázni při 50 °C. Přidá se 50 µl PK (25 mg/1 ml), inkubuje se přes noc v termostatu při 37 °C.

2. den, každý vzorek se rozdělí do dvou označených zkumavek (1,5 ml), následná extrakce pak probíhá paralelně. Extrakce chloroformem I: eppendorfka se naplní, 6 min. se důkladně protřepává, centrifuguje se 7 min./12000 rpm při 25 °C, vzorek se přepipetuje do čistých zkumavek a proces se opakuje. Extrakce chloroformem II: opět se přidá chloroform a třepe 6 min., centrifugace při 15 °C 5 min./6000 rpm, opakuje se 2 krát. Po závěrečném přepipetování vzorku do čisté označené eppendorfky se sráží DNA přídatkem 0,5 ml vychlazeného 100% ethanolem + CH<sub>3</sub>COONa (9 dílů alkoholu, 1 díl octanu). Centrifuguje se 3 min./14000 rpm, odsaje se, peleta se promyje 70% ethanolem. Alkohol se odsaje, nechá se vyschnout a převrství TE pufrům jako u izolace DNA z plné krve. Příprava PBS pufru: do kádinky 1 litr navážíme: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \*12 H<sub>2</sub>O, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, následně doplníme destilovanou vodou a upravíme pH na 7,4 pomocí HCl, uchováváme v chladu. Metodika vychází z metodiky ASHWELL et al., (1996).

#### **4.1.3 Genotypizace**

Genotypizace byly prováděny zejména standardní metodou polymerázové řetězové reakce s navazující restrikční analýzou (PCR-RFLP). Výjimkou byla genotypizace CVM, kdy byla použita modifikovaná alelově specifická PCR.

### 4.1.3.1 Genotypizace lokusů na BLAD, DUMPS, citrulinémii

Genotypizace lokusů na BLAD, DUMPS a citrulinémii byla prováděna samostatně metodou PCR-RFLP. Primery, Master mix, teplotní režimy v termocyklerech, použití restriktáz bylo odvozeno dle metodiky příslušných autorů, případné odchylky vznikly optimalizací k aktuálním podmínkám pro laboratoř genetiky a molekulární biologie Katedry genetiky, šlechtění a výživy zvířat, Zemědělské fakulty. Primery byly připravovány firmou Generi Biotech, s.r.o. (tab. 1). Složení Master mixů a podmínky PCR jsou uvedeny v tab. 2–3.

Tab. 1: Složení primerů používaných pro tvorbu specifických ampliconů PCR pro detekci lokusů vybraných dědičných onemocnění

Lokus pro onemocnění	Primery - forward, reverse
BLAD (autor testu) (TAMMEN 1994,1996; SHUSTER et al., 1992a)	5' - GTCAGGCAGTTGCGTTCAA - 3'
	5' - GAGGTCATCCACCATCGAGT - 3'
DUMPS (autor testu) (SCHWENGER et al., 1993)	5' - GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG- 3'
	5' - GCTTCTAACTGAACTCCTCGAGT - 3'
Citrulinémie (autor testu) (DENNIS et al., 1989)	5' - GTGTTTCATTGAGGACATC - 3'
	5' - CCGTGAGAGACATACTTG - 3'

Tab. 2: Složení Master mixu pro PCR, podle typu izolace DNA, pro jednotlivé lokusy

Komponent (μl) (celkem 20 μl)	Lokusy pro					
	BLAD		DUMPS		Citrulinémie	
	DNA	DNA (lyzát)	DNA	DNA (lyzát)	DNA	DNA (lyzát)
10x PCR pufr	2	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	2,4	2,4	1,2	1,2	1,2	1,2
dNTP's	2	2	2	2	2	2
Primer forward *	1	1	1	1	1	1
Primer reverse *	1	1	1	1	1	1
DNA	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Taq polymeráza 1U**	0,2	2	0,2	2	0,2	2
H <sub>2</sub> O	10,1	8,3	11,3	9,5	11,3	9,5

\* množství oligo 10 pmol; \*\* při použití lyzátů se nedává Taq (1U = 0,2 µl) do mixu, ale ředěný po dvouminutové denaturaci proteinázy K při 94 °C. Při ředění se vychází z toho, že na 1 vzorek je 0,2 µl Taq a 1,8 µl vody.

Tab. 3: Teplotní režimy pro PCR

Lokusy			Poznámka
BLAD	DUMPS	Citrulinémie	
104 °C			Víčko předeheřtí
94 °C 3 min.	94 °C 5 min.	94 °C 5 min.	Predenaturace, u DNA získané lyzační metodikou se po 2 min. přidává Taq polymeráza
94 °C 30 s	94 °C 60 s	94 °C 45 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 35 cyklů
61 °C 30 s	61 °C 60 s	61 °C 45 s	
72 °C 30 s	72 °C 30 s	72 °C 45 s	
72 °C 5 min.	72 °C 5 min.	72 °C 4 min.	Finální elongace

Tab. 4: Podmínky pro působení použitých restričních endonukleáz II. třídy (RE), pro genotypizované lokusy

Složky mixu	Lokusy			
	BLAD		DUMPS	Citrulinémie
Pufr	1,7 µl	1,7 µl	1,7 µl	1,7 µl
RE (koncentrace)	<i>TaqI</i> 10 U	<i>HaeIII</i> 10 U	<i>AvaI</i> 10 U	<i>AvaII</i> 10 U
PCR amplifikát	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Inkubace (přes noc)	65°C	37°C	37°C	37°C

PCR byla prováděna na termálních cyklerech Biometra Termogradient. Kvalita PCR amplifikátů byla ověřována elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu (1x TBE: 89 mM Tris, 89 mM kyseliny borité, 2 mM EDTA) obarveném ethidium bromidem, ověřování velikosti

porovnáním s komerčním markerem pUC19 DNA/*Msp*I, Marker 23, vizualizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Kvalitní produkt PCR byl vystaven působení příslušné RE od firmy Fermentas za podmínek uvedených v tab. 4. Vlastní genotypizace vybraných lokusů onemocnění probíhá na základě rozdělení produktů PCR-RFLP dle rozdílných délek fragmentů v bp. Fragmenty jsou nejprve pomocí několik desítek minut probíhající ELFO rozděleny dle velikosti na 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem, velikosti jsou zjišťovány porovnáním s komerčním markerem pUC19 DNA/*Msp*I, Marker 23, poté vizualizovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Tab. 5: Genotypizace, délky fragmentů u dědičných chorob

	Lokusy			
	BLAD		DUMPS	Citrulinémie
PCR produkt	101 bp		108 bp	177 bp
Restrikční endonukleáza	<i>Taq</i> I (TAMMEN et al., 1994, 1996)	<i>Hae</i> III (TAMMEN et al., 1994, 1996)	<i>Ava</i> I (SCHWENGER et al., 1993)	<i>Ava</i> II (DENNIS et al., 1989)
Dominantní homozygot, zdravý	TL: 52+32+17 bp	TL: 65+36 bp	TD: 53+36+19 bp	99+78 bp
Heterozygot, přenašeč	BL: 84 +52+32+17 bp	BL: 65+46+36+19 bp	DP: 89+53+36+19 bp	177+99+78 bp
Recesivní homozygot, postižený	BLAD: 84+17 bp	BLAD 46+36+19 bp	DUMPS 89+19 bp	177 bp

#### 4.1.3.2 Genotypizace lokusu na CVM

Genotypizace lokusu na CVM, byla prováděna formou zakázky ČMSCH, a.s. laboratoří imunogenetiky v Hradištku pod Medníkem. Skrytí heterozygotní nositelé alely pro CVM byli genotypizováni dle genetického testu Danish Institute of Agricultural Science, International patent WO 02/40709 A2, 2002, modifikovanou metodou AS-PCR.

Pro praktické účely genotypizace zvolila laboratoř ČMSCH praktickou variantu s použitím AmpliTaq Gold DNA polymerázy v alelově specifické PCR s pracovním názvem "The CVM-AmpliTaq Gold test". V testu je více párů primerů, které nasedají ve dvou různých oblastech. To snižuje konkurenci mezi alelově specifickými primery. Alelově specifické primery jsou navrženy odlišně v jedné bázi příčinného nukleotidu pro mutaci tvořící 3'- konec primeru: "reverse" primer bez příčinné mutace s bází C nebo "reverse" primer s příčinnou mutací s bází A, také "forward" primer s příčinnou mutací s bází T. Zároveň do výše uvedených primerů byla zavedena i nesouladná (mismatch) báze hned vedle již uváděné poslední báze 3'- konce. Tyto primery byly vedeny jako: C\_mism1 (reverse), A\_mism1 (reverse), T\_mism1 (forward). Pro možnost uskutečnění AS-PCR bylo nutné zavedení ještě dvou primerů s označením Fwd1 (forward) a Rev1 (reverse). Tyto dva primery spolu s výše uvedenými jsou nezbytné pro tvorbu PCR amplifikátů rozdílné velikosti, ale zároveň spolu vytváří kontrolní produkt, jako pozitivní kontrolu, potvrzující správný průběh reakce. Primery byly kompletovány dánskou firmou DNA-Technology. Využíváním AmpliTaq Gold DNA polymerázy a výše uvedených opatření, bylo docíleno větší stability reakcí včetně vyšší přesnosti genotypizace, ve srovnání s jinými modifikacemi reakcí.

Při genotypizaci se postupně uskutečňují dvě reakce, kdy první reakce je označena jako (C+T) podle poslední báze 3'- konce jednoho primeru z páru, tyto páry jsou dva. První pár tvoří primery: C\_mism1 (reverse) a Fwd1 (forward), druhý pár tvoří primery T\_mism1 (forward) a Rev1 (reverse). Rovněž primery Rev1 (reverse) a Fwd1 (forward) tvoří třetí pár. Následně je provedena ELFO na 2% agarózovém gelu s ethidium bromidem za přítomnosti komerčního ladderu s následnou genotypizací pod UV světlem.

Druhá následná (A+T) reakce je kontrolní, má potvrdit správnost předchozí genotypizace, je tvořena párem primerů: A\_mism1 (reverse) a Fwd1 (forward), druhý pár tvoří primery T\_mism1 (forward) a Rev1 (reverse). Rovněž primery Rev1 (reverse) a Fwd1 (forward) tvoří třetí pár. Následně je provedena ELFO na 2% agarózovém gelu s ethidium bromidem za přítomnosti komerčního ladderu s následnou genotypizací pod UV světlem. Pokud některý z alelově specifických primerů není schopen nasednout na testovanou DNA vzhledem k nekomplementaritě jeho 3'- konce, kde je umístěn rozhodující nukleotid vzhledem k mutaci, nedojde ani k tvorbě specifického PCR amplifikátu u každé ze dvou uvedených reakcí.

Detailní informace jsou následně uvedeny v textu formou tabulek (6–15).



**Popis (C+T) reakce:**

Tab. 6: Složení primerů používaných v C+T reakci pro tvorbu specifických ampliconů PCR pro genotypizaci jedinců ve vztahu k postižení CVM.

Označení primeru	Sekvence primeru	Poznámky
C_mism1 (reverse)	5'- CTGGAAAAACATGCTGTGAGAT <u>C</u> -3'	primer nasedající na řetězec bez mutace ( <u>C</u> ), <u>T</u> nesouladná (mismatch) báze
Fwd1 (forward)	5'- CCTTAAGGTCTAAGAGTGGGC -3'	forward primer, neobsahuje příčné místo
Rev1 (reverse)	5'- CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG -3'	reverse primer, neobsahuje příčné místo
T_mism1 (forward)	5'- CAGCTGGCTCACAATTTGTAGGTC TCATGGC <u>C</u> T -3'	primer nasedající na řetězec s mutací ( <u>T</u> ), <u>C</u> nesouladná (mismatch) báze

Tab. 7: Složení Master mixu pro PCR, v C+T reakci

Komponent	Množství (celkem 10 µl)
genomová DNA	20–100 ng
AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0,1 µl
dNTPs (2,5mM)	0,75 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,4 µl
10 x pufr II pro AmpliTaq Gold	1 µl
primer Fwd1 (5 pmol/ µl)	0,75 µl
primer Rev1 (5 pmol/ µl)	0,75 µl
primer C_mism1 (5 pmol/ µl)	0,25 µl
primer T_mism1 (5 pmol/ µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Tab. 8: Teplotní režimy pro GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) pro C+T reakci

Teplota / čas	Poznámka
94 °C /12 min.	Predenaturace
94 °C /30 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 33 cyklů
60 °C /30 s	
72 °C /30 s	
72 °C /7 min.	Finální elongace
4 °C	Uchováno

Tab. 9: Informace o jednotlivých PCR produktech: C+T reakce

PCR produkty - velikost (bp)	Účast primerů na produktu	Poznámka
430	Fwd1 (forward) + Rev1 (reverse)	produkt kvality reakce, vždy přítomen
297	T_mism1 (forward) + Rev1 (reverse)	přítomnost alely s CVM mutací
180	C_mism1 (reverse) + Fwd1 (forward)	přítomnost alely bez mutace

Tab. 10: Genotypizace AS-PCR heterozygotů CVM, z reakce C+T.

PCR amplifikáty - velikost (bp)	Genotypizace
430+180	TV jedinec je zdrav
430+297+180	CV jedinec - heterozygot
430+297	CVM – postižení

**Popis (A+T) reakce:**

Tab. 11: Složení primerů používaných v A+T reakci pro tvorbu specifických amplikonů PCR pro genotypizaci jedinců ve vztahu k postižení CVM

Označení primeru	Sekvence primeru	Poznámky
A_mism1 (reverse)	5'- GCAAAGCCACTGGAAAAACATGCT GTGAGACA-3'	reverse primer nasedající na řetězec s příčinnou mutací ( <b>A</b> ), <u>C</u> nesouladná (mismatch) báze
Fwd1 (forward)	5'- CCTTAAGGTCTAAGAGTG GGC -3'	forward primer, neobsahuje příčinné místo
Rev1 (reverse)	5'- CGATGAAAAAGGAACCAAAGGG -3'	reverse primer, neobsahuje příčinné místo
T_mism1 (forward)	5'- CAGCTGGCTCACAATTTGTAGGTCTC ATGGCCT -3'	forward primer nasedající na řetězec s příčinnou mutací ( <b>T</b> ), <u>C</u> nesouladná (mismatch) báze

Tab. 12: Složení Master mixu pro PCR, v A+T reakci

Komponent	Množství (celkem 10 µl)
genomová DNA	20–100 ng
AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)	0,1 µl
dNTPs (2,5mM)	0,75 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,4 µl
10 x pufr II pro AmpliTaq Gold	1 µl
primer Fwd1 (5 pmol/ µl)	1 µl
primer Rev1 (5 pmol/ µl)	1 µl
primer A_mism1 (5 pmol/ µl)	0,25 µl
primer T_mism1 (5 pmol/ µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Tab. 13: Teplotní režimy pro GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) pro A+T reakci

Teplota / čas	Poznámka
94 °C /12 min.	Predenaturace
94 °C /30 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 33 cyklů
60 °C /30 s	
72 °C /30 s	
72 °C /7 min.	Finální elongace
4 °C	Uchováno

Tab. 14: Informace o jednotlivých PCR produktech: A+T reakce

PCR produkty - velikost (bp)	Účast primerů na produktu	Poznámka
430	Fwd1 (forward) + Rev1 (reverse)	produkt kvality reakce, vždy přítomen
297	T_mism1 (forward) + Rev1 (reverse)	přítomnost alely s CVM mutací
180	A_mism1 (reverse) + Fwd1 (forward)	přítomnost alely s CVM mutací

Tab. 15: Genotypizace heterozygotů (CV), z reakce A+T

PCR produkty - velikost (bp)	Genotypizace
430	TV jedinec je zdrav
430+297+180	CV jedinec - heterozygot; případně CVM

#### 4.1.3.3 Genotypizace lokusů na GSD II a GSD V

Genotypizace lokusů na GSD II a GSD V byla prováděna metodou PCR-RFLP. Primery, Master mixy, teplotní režimy v termocyklerech, použití restriktáz bylo odvozeny dle metodik příslušných autorů uváděno v tabulkách (16–20), případné odchylky vznikly optimalizací k aktuálním podmínkám. Pro naše potřeby byly primery připravovány firmou Generi Biotech, s.r.o.

Tab. 16: Složení primerů používaných pro tvorbu specifických amplikonů PCR pro detekci lokusů vybraných dědičných onemocnění

Lokus pro onemocnění	Primery - forward, reverse
GSD V, exon 12, kodon 489 (SOETHOUT et al., 2002; BILSTROM et al., 1998)	5'- CCAGGAAGACCCTCATTTCCA -3'
	5'- AGGGAAACACACACACAG -3'
GSD II, exon 7, místo 1057 (DENNIS et al., 2002)	5'- GGACGTGTACATCTTCTTGG -3'
	5'- GTCATATTCTCCACGACC -3'
GSD II, exon 9, místo 1351 (DENNIS et al., 2002)	5'- GGGACCTACCGACCCTACGACGAGCCTCTGAGG -3'
	5'- GTCAGAAGCCACTATAACC -3'
GSD II, exon 13, místo 1783 (DENNIS et al., 2002)	5'- ACTGCCCTGCACTCTTGCCGGCCGT -3'
	5'- GGAAAGCTGCTCCCGGTCGCTCC -3'

Tab. 17: Složení Master mixu pro PCR, podle typu izolace DNA

Komponent (celkem 20 µl)	Lokusy							
	GSD V		GSD II E7		GSD II E9		GSD II E13	
	DNA	DNA (lyzát)	DNA	DNA (lyzát)	DNA	DNA (lyzát)	DNA	DNA (lyzát)
	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
10x PCR pufir	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	0,8	0,8	1	1	0,8	0,8	1	1
dNTP's	2	2	2	2	2	2	2	2
Primer forward *	1	1	0,8	0,8	1	1	1	1
Primer reverse *	1	1	0,8	0,8	1	1	1	1
DNA	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Taq polymeráza **	0,2	2	0,2	2	0,2	2	0,2	2
H <sub>2</sub> O	11,7	9,9	11,9	10,1	11,7	9,9	11,5	9,7

\* množství oligo 10 pmol; \*\* běžně do mixu neředěný Taq (1U = 0,2μl), při použití lyzátů se Taq ředí: na vzorek je 0,2 μl Taq a 1,8 μl vody a přidává se po dvouminutové denaturaci proteinázy K při 94 °C.

Tab. 18: Teplotní režimy pro PCR požadovaných lokusů, nastaveno pro termální cykler Biometra Termogradient

Lokusy				poznámka
GSD V E12	GSD II E7	GSD II E9	GSD II E13	
104 °C				Víčko předehtátí
94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	Predenaturace, u DNA získané lyzační metodikou se po 2 min. přidává Taq polymeráza
94 °C/60 s	94 °C/60 s	94 °C/60 s	94 °C/60 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 35 cyklů
61 °C/60 s	54 °C/60 s	62 °C/60 s	59 °C/60 s	
72 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/60 s	
72 °C/4 min.	72 °C/4 min.	72 °C/4 min.	72 °C/4 min.	Finální elongace

Kvalita PCR amplifikátů byla ověřována elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu (jedenkrát TBE: 89 mM Tris, 89 mM kyseliny borité, 2 mM EDTA) obarveném ethidium bromidem, ověřování velikosti porovnáním s komerčním markerem pUC19 DNA/*MspI*, Marker 23, vizualizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Tab. 19: Podmínky pro působení použitých restrikčních endonukleáz II. třídy (RE), pro genotypizované lokusy

Složky mixu	Lokusy			
	GSD V E12 (exon)	GSD II E7 (exon)	GSD II E9 (exon)	GSD II E13 (exon)
Pufr	1,7 μl	1,7 μl	1,7 μl	1,7 μl
Restrikční endonukleáza (koncentrace)	<i>StyI</i> 10 U	<i>BglI</i> 10 U	<i>BglI</i> 10 U	<i>BsiEI</i> 10 U
PCR amplifikát	15 μl	15 μl	15 μl	15 μl
Inkubace (přes noc)	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C

Vlastní genotypizace vybraných lokusů onemocnění probíhá na základě rozdělení produktů PCR-RFLP dle rozdílných délek fragmentů v bp. Fragmenty jsou nejprve pomocí několik desítek minut probíhající ELFO nejprve rozděleny dle velikosti na 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem, velikosti jsou zjišťovány porovnáním s komerčním markerem pUC19 DNA/*Msp*I, Marker 23 a potom vizualizovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Tab. 20: Genotypizace GSD V a GSD II - velikosti RFLP fragmentů

Typ postižení, Exon genu	Lokusy			
	GSD V E12	GSD II E7	GSD II E9	GSD II E13
PCR produkt	252 bp	238 bp zdravý homozygot 236 bp* a 238 bp heterozygot 236 bp* postižený homozygot	179 bp	192 bp
RE	<i>Sty</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II	<i>Bsi</i> EI
Dominantní homozygot (zdráv);	252 bp	190+48 bp	81+68+30 bp	116+39+22+15 bp
Heterozygot (přenašeč);	252+133+119 bp	190+161+48+27 bp **	98+81+68+30 bp	155+116+39+22+15 bp
Recesivní homozygot; (postižený)	133+119 bp	161+48+27 bp **	98+81 bp	155+22+15 bp

\* dinukleotidová delece v PCR (heterozygota; homozygota recesivního)

\*\* vliv dinukleotidové delece v PCR na produkty RFLP

#### 4.1.3.4 Genotypizace lokusů na deficit krevního koagulačního faktoru XI

Genotypizace lokusu *FXI* na přítomnost mutace v exonu 12 byla provedena dle metodiky MARRON et al. (2004), metoda je založena na PCR a následném rozdílu mezi délkou fragmentů.

Detailní informace jsou následně uvedeny v textu formou tabulek (21–23).

Tab. 21: Primery pro tvorbu specifických amplikonů PCR k detekci mutace v exonu 12

Lokus v exonu 12	Primery - forward, reverse
	5'- CCCACTGGCTAGGAATCGTT -3'
	5'- CAAGGCAATGTCATATCCAC -3'

Tab. 22: Složení Master mixu PCR pro lokus v exonu 12 genu *FXI*

Komponenty celkem	PCR pufr	dNTPs	Taq DNA polymeráza	MgCl <sub>2</sub>	Genomová DNA	Primery forward a reverse	H <sub>2</sub> O
20 µl	1x	0,2 mM	0,5 units	1,5 mM	100 ng	20 nmol	ad 20 µl

Tab. 23: Podmínky pro PCR na termocykleru Biometra Termogradient

Teplota /čas	Poznámka
104 °C	Víčko předehtátí
95 °C /10 min	Predenaturace
95 °C /30 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 34 cyklů
55 °C /60 s	
72 °C /30 s	
72 °C /10 min.	Finální elongace
4 °C	Uchováno

Separace PCR fragmentů na agarózovém gelu 2,5%, 1krát TBE (89 mM TRIS, 89 mM kyseliny borité, 2 mM EDTA) obarveném ethidium bromidem. Amplifikáty mají různou délku, alely tedy lze rozlišit elektroforeticky. Pro detekci byl použit velikostní marker pUC19 DNA/*Msp*I. Genotypizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm. Způsob genotypizace jedinců je uveden v tab. 24.



Tab. 24: Genotypizace deficitu FXI - ampliconů PCR, exon 12

Zdravý jedinec homozygot, wild typ	244 bp
Přenašeč, heterozygot	244 bp a 320 bp
Postižený jedinec homozygot	320 bp

Genotypizace lokusu *FXI* na přítomnost mutace v exonu 9 byla provedena dle metodiky KUNIEDA et al. (2005), metoda je založena na PCR a následném rozdílu mezi velikostmi fragmentů. Navržené primery používané pro tvorbu specifických ampliconů PCR k detekci mutace v exonu 9 uvádí tab. 25. PCR a výsledná genotypizace probíhala za podobných podmínek jako u předešlého exonu tab. 23.

Detailní informace o složení Master mixu PCR a genotypizaci jsou uvedeny v textu v tabulkách (26–27).

Tab. 25: Primery pro tvorbu specifických ampliconů PCR k detekci mutace v exonu 9

Lokus v exonu 9	Primery - forward, reverse
	5' - TCACATCTCAATATGTGCTTCTGC -3'
	5' - TCTACGATGTCCAGTTCTTCTCC -3'

Tab. 26: Složení Master mixu PCR pro lokus v exonu 9 genu *FXI*

Komponenty	PCR	dNTPs	Taq DNA	MgCl <sub>2</sub>	Genomová	Primery	H <sub>2</sub> O
Celkem	pufř		polymeráza		DNA	forward a reverse	
20 µl	1x	0,2 mM	0,5 units	1,5 mM	100 ng	20 nmol	ad 20 µl

Tab. 27: Genotypizace deficitu FXI – ampliconů PCR, exon 9

Zdravý jedinec homozygot, wild typ	95 bp
Přenašeč, heterozygot	95 bp a 110 bp
Postižený jedinec, homozygot	110 bp

## 4.2 Restrikční analýza části lokusu *ITGB2* (*CD18*)

### 4.2.1 Restrikční analýza části lokusu *ITGB2* (*CD18*) u 10 holštýnských krav se statusem TL

NCBI Gene Symbol: *ITGB2*; (synonymum *CD18*); Gen ID: 281877; Genomic Location: Chr1.150, pozice 306763 až 335924 bp, velikost 29161 bp; 16 exonů – délka po úplném sestřihu 2818 bp.

Genotypizace s následnou detekcí restrikčních polymorfismů bovinní DNA v části lokusu *CD18* (SHUSTER et al,1992a), o velikosti 11201 bp, od 2.–11203. bp (tab. 28), byla prováděna metodou PCR-RFLP, s postupným využitím deseti vybraných restrikčních endonukleáz třídy II (RE) od firmy Fermentas (tab. 31), které byly vybrány tak, aby postihly velký rozsah cílových sekvencí.

Analyzována byla DNA deseti náhodně vybraných holštýnských krav narozených v letech 1997–2003 se statusem TL, zdravých dominantních homozygotů – bez BLAD. Izolace DNA z krve lyzátovou metodou (kapitola 4.1.2.2).

Zkoumaná část lokusu DNA byla PCR amplifikací postupně rozdělena pomocí 21 párů primerů (tab. 28), na 21 navazujících nebo překrývajících se úseků o délkách v rozpětí 363–828 bp (tab. 28). Přesto mezi některými úseky zůstalo několik míst v celkovém rozsahu 2476 bp, které se nestaly součástí zkoumaných úseků, z důvodu rozmístění primerů. Skutečně analyzovaný rozsah úseků genu je 8725 bp.

Navržené sekvence primerů byly syntetizovány v programu firmy Proligo; SIGMA ALDRICH s.r.o., ve spolupráci s firmou Biogen Praha, s.r.o.

Každého typu PCR amplifikátu, u každého zvířete bylo zhotoveno takové množství, aby stačilo k provedení RFLP pro 10 vzorků, každý vzorek byl vystaven účinku jedné z deseti RE (tab. 31). Vzorky byly inkubovány za příslušné teploty, po dobu 12 hodin (tab. 31).

Celkem tak bylo metodou PCR-RFLP genotypizováno 210 skupin vzorků, kdy skupinu tvořilo 10 vzorků z DNA deseti holštýnských plemenic, téhož typu PCR amplifikátu (ze stejné dvojice primerů), vždy po restrikci stejnou endonukleázou. Každá skupina je tak z hlediska výskytu restrikčních polymorfismů DNA vyhodnocována samostatně.

Tab. 28: Použité dvojice primerů k produkci 21 typů amplifikátů PCR

Číslo páru primerů	Vymezení úseku lokusu (pořadí nukleotidů)	Velikost PCR amplifikátu (bp)	sekvence primerů
1.	3–831	828	5'-CTGAACAGTGGAGCAGATGA-3'
			5'-CACCTGCACTTGTAACGACT-3'
2.	485–1153	668	5'-TTGGCTGAGTGAAGGCTCTG-3'
			5'-TCTGAGGCTGGTGGATAGGA-3'
3.	936–1690	754	5'-TTGCTTAGCAGCTGGTGGTA-3'
			5'-TGGCACTCCTTCTCCTTGTT-3'
4.	1671–2065	394	5'-AAC AAGGAGAAGGAGTGCCA-3'
			5'-ACGTCACAGATACAGCGCAG-3'
5.	2–581	579	5'-CCTGAACAGTGGAGCAGATG-3'
			5'-ATCAGAGCCTTCACTCAGCC-3'
6.	2758–3236	478	5'-GCTGCCACCTGGAAGACAAC-3'
			5'-CCGTGTCTCCTGTGTCTCCT-3'
7.	2064–2594	530	5'-GTCAGTGTTACAGCGCGTCG-3'
			5'-CCACAGACTGCAGGAGCCAA-3'
8.	3097–3496	399	5'-AAGGTGACATCTGAGGTTCC-3'
			5'-AGAAGTCCAGTGGCAAGTAA-3'
9.	3438–4020	582	5'-TGCTGCTCACTCATCTCCAC-3'
			5'-CACGATCACTGAGCCACAGG-3'
10.	10840–11203	363	5'-CGTGGCTGACAACTTCACCG-3'
			5'-CTCAGAGTGCAGTGGCAGAG-3'
11.	9885–10437	552	5'-GGCATGTGGCAGTCCAGAGA-3'
			5'-AGGTCGCTCAGGTGTGTCAG-3'
12.	8988–9464	476	5'-GGAGGACAGTTGCAGATAGT-3'
			5'-TGGAAGCCTGTGCTCGTACC-3'
13.	7432–8148	716	5'-CCTGGAGCCACCTGGAATGT-3'
			5'-ACTTGGCCGTCGTAGCGTTC-3'
14.	6369–7067	698	5'-AGGGCATCACAGCAGGGTTG-3'
			5'-GGATGATCTCTGTCAGCTTC-3'
15.	5392–6087	695	5'-CCACACAACACTGACCATGC-3'
			5'-GAGAGAGACAGACACAGAGA-3'
16.	5553–6046	493	5'-GACAGAAGCTGACAGAGATC-3'
			5'-AGGTAGACAGAGAGGTGAGA-3'
17.	4927–5569	642	5'-AGGGCATCACAGCAGGGTTG-3'
			5'-CTCTGTCAGCTTCTGTCAGG-3'
18.	4514–5131	617	5'-ATGCAACAGTCTCTCCTCAC-3'
			5'-CCAGTCCAGGTACACCTCTT-3'
19.	4507–5244	737	5'-TTACCGGATGCAACAGTCTC-3'
			5'-GGCATGAAGTCAGGAAGCAA-3'
20.	4002–4590	588	5'-CTGTGGCTCAGTGATCGTGG-3'
			5'-CCTCTCACCACACTGCCTTC-3'
21.	4927–5618	691	5'-AGGGCATCACAGCAGGGTTG-3'
			5'-CGTTCCTGGAATCTTCAGAC-3'

Tab. 29: Složení PCR Master mixu, dle jednotlivých úseků DNA části lokusu *ITGB2*

Úsek Číslo	PCR pufr	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primery		DNA	* Ředěná Taq DNA polymeráza	H <sub>2</sub> O	mix celkem
	μl	μl	μl	Forw. μl	Rev. μl	μl	μl	μl	μl
1; 2; 11; 16; 18; 20;	2,5	3,5	0,8	2,5	2,5	1	3	9,2	25
3;	2,5	3	0,8	2,5	2,5	1	3	9,7	25
4; 10; 17;	2,5	2,5	0,8	2,5	2,5	1	3	10,2	25
5; 8;	2,5	2,2	0,8	3,3	3,3	1	3	8,9	25
6;	2,5	1,5	0,8	2,5	2,5	1	3	11,2	25
7;	2,5	2,5	0,8	3,5	3,5	1	3	8,2	25
9;	2,5	2	0,8	2,5	2,5	1	3	10,7	25
12;	2,5	1,8	0,8	1,5	1,5	0,9	3	13	25
13;	2,5	1,5	0,8	1,5	1,5	1	3	13,2	25
14; 19;	2,5	3,5	1	2,5	2,5	1,5	3	8,5	25
15; 21	2,5	2,8	0,8	2,5	2,5	1	3	9,9	25

\* Poznámka: Naředěná Taq polymeráza: 0,6 μl Taq + 2,4 μl H<sub>2</sub>O; není přímo obsažena v Master mixu, ale je přidávána do termocykleru po 5 minutách;

Master mixy PCR pro jednotlivé úseky se mohou poměrem svých složek vzájemně shodovat nebo lišit. Složení Master mixů a teplotní poměrů v procesu PCR, jsou vlastním výsledkem optimalizace metodiky laboratorních postupů (tab. 29–30). Optimalizace je nutná vzhledem ke strukturní rozdílnosti používaných dvojic primerů, délce a kvalitě DNA úseků. Amplifikace úseků PCR byla provedena na termálních cyklerech Biometra Termogradient.

Tab. 30: Optimalizované podmínky pro PCR na termálním cykleru, dle úseků.

Čísla jednotlivých úseků				
3; 4;	1; 2; 5; 8;	7; 9; 10; 11; 13; 14; 16; 17; 18; 19; 20;	6; 12; 15; 21	
Teplota /čas	Teplota /čas	Teplota /čas	Teplota /čas	Poznámka
104 °C				Předeheřtí vřčka
95 °C /10 min.	95 °C /10 min.	95 °C /10 min.	95 °C /10 min.	Predenaturace (po 5 minutách přídavek ředěné Taq DNA polymerázy)
95 °C /40 s	95 °C /40 s	95 °C /40 s	95 °C /40 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 34 cyklů
59 °C /40 s	60 °C /40 s	64 °C /40 s	65 °C /40 s	
72 °C /90 s	72 °C /90 s	72 °C /90 s	72 °C /90 s	
72 °C /30 min.	72 °C /30 min.	72 °C /30 min.	72 °C /30 min.	Finální elongace
4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	Uchováno při teplotě

Ověřování kvality PCR amplifikátů metodou ELFO (elektroforézou) na 2,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem, ověřování velikosti porovnáním s komerčním markerem pUC19 DNA/*MspI*, Marker 23, vizualizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Detekce výskytu cílových sekvencí pro jednotlivé RE - metodou RFLP s ELFO na 3,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Genotypizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm, odečet přibližných velikostí vzniklých restrikčních fragmentů – porovnáním s komerčními velikostními markery pUC19 DNA/*MspI*, Marker 23 nebo GeneRuler™ 100 bp DNA ladder od firmy Fermentas a odpovídajícími nerestrigovanými PCR amplifikáty – kontrola.

Restrikční polymorfismus DNA, každé z 21 skupin PCR amplifikátů, je vyhodnocen samostatně, vždy u skupiny všech deseti krav najednou a po účinku stejné RE.

Za restrikční polymorfismus v rámci jednoho typu amplifikátu PCR a jedné RE lze považovat výskyt dvou typů homozygotních restrikčních modelů, což je dáno přítomností a počtem restrikčních míst, v genotypizované skupině zvířat, nebo výskyt heterozygotního restrikčního modelu s rozdílným výskytem restrikčních míst u jednotlivců.

Tab. 31: Výčet použitých restričních endonukleáz třídy II s vyjádřením štěpných míst, a inkubačních teplot

RE – štěpné místo	Inkubační teplota	RE – štěpné místo	Inkubační teplota
<i>AluI</i> 5'..AG↓CT...3' 3'..TC↑GA.. 5'	37 °C	<i>Bsu15I (ClaI)</i> 5'..AT↓CGAT...3' 3'..TAGC↑TA.. 5'	37 °C
<i>Eco88I (AvaI)</i> 5'..C↓PyCGPuG...3' 3'..GPuGCPy↑C.. 5'	37 °C	<i>Eco47I (AvaII)</i> 5'..G↓GACC...3' 3'..CCTG↑G.. 5'	37 °C
<i>Eco130I (StyI)</i> 5'..C↓CTTGG...3' 3'..GGAAC↑C...5'	37 °C	<i>HaeIII</i> 5'..GG↓CC...3' 3'..CC↑GG.. 5'	37 °C
<i>HindIII</i> 5'..A↓AGCTT...3' 3'..TTCGA↑A...5'	37 °C	<i>HpyF31 (DdeI)</i> 5'..C↓TNAG...3' 3'..GANT↑C...5'	37 °C
<i>TaqI</i> 5'..T↓CGA...3' 3'..AGC↑T... 5'	37 °C	<i>TruI (MseI)</i> 5'..T↓TAA...3' 3'..AAT↑T...5'	37 °C

#### 4.2.2 Restriční analýza části lokusu *ITGB2 (CD18)* u pěti holštýnských krav se statusem BL, včetně dvou kontrolních zvířat se statusem TL

Akreditovaná laboratoř imunogenetiky ČMSCH, a.s. v Hradištku pod Medníkem poskytla krve pěti holštýnských plemenic s ověřeným statusem BL (heterozygotní přenašeči – BLAD) a dvou dalších kontrolních jedinců se statusem TL, zvířata narozena rovněž v letech 1997–2003. Ze vzorků krve každé z těchto plemenic byla izolována DNA lyzátovou metodou.

Metodika PCR-RFLP provedení byla téměř shodná s předchozí částí výzkumu. Analyzována byla stejná část lokusu *CD 18*, s využitím stejných 21 dvojic primerů – typů PCR amplifikátů a včetně podmínek pro jejich vznik a způsobu ověření kvality. Pro metodu RFLP byly použity stejné RE (tab. 1, 2, 3), včetně provedené genotypizace a způsobu hodnocení výskytu restričních polymorfismů DNA.

Rozdílný byl pouze počet a status hodnocených jedinců, kdy skupinu tvořilo 5 (BL) + 2 (TL) zvířat, vždy s PCR amplifikátem stejného typu (z celkových 21) a s restrikcí

stejným typem RE. Každá skupina tak byla z hlediska výskytu restričních polymorfismů DNA vyhodnocována samostatně.

Vyhodnocen a porovnán byl restriční polymorfismus DNA mezi pěti BL jedinci a všemi TL jedinci.

#### **4.2.3 Detekce tiché bodové mutace c.775C>T v lokusu *CD18* skotu holštýnského plemene, zvířat se statusem TL nebo BL a u českého strakatého skotu, metodou PCR-RFLP**

Detekce tiché bodové mutace (TM) c.775C>T bez fenotypové manifestace, v lokusu *CD18* skotu holštýnského plemene zvířat (SHUSTER et al., 1992b) se statusem TL a BL a u TL jedinců českého strakatého skotu metodou PCR-RFLP.

Celkový panel zvířat byl sestaven ze zvířat dvou plemen. Holštýnské plemeno zastupovalo 34 náhodně vybraných býků z 5 linií, narozených v letech 1998–2003, a 10 krav s ověřeným statusem TL. Dále bylo analyzováno 14 holštýnů s ověřeným statusem BL, narozených v období 1994–2006, z toho 9 krav s jalovicemi a 5 mladých býčků, tato zvířata byla součástí tří příbuzenských skupin. Druhou plemennou skupinou bylo 35 náhodně vybraných býků českého strakatého skotu z 9 linií, narozených v letech 2000–2003, se statusem TL.

Vzorky zvířat plemene holštýn a český strakatý skot byly poskytnuty akreditovanou laboratoří imunogenetiky ČMSCH, a.s. v Hradištku pod Medníkem.

DNA zvířat byla získána z krve lyzátovou metodou nebo spermatu komerčními kity. Pro identifikaci tiché bodové mutace v lokusu *CD18* (SHUSTER et al., 1992b) byla použita metoda PCR-RFLP dle CZARNIK et al. (2007a), nevyužívající cDNA.

Na základě práce CZARNIK et al. (2007a) byl syntetizován pár primerů (tab. 32), který vymezil požadovaný úsek DNA (PCR amplifikát), v němž se nachází sekvence s výskytem tiché bodové mutace. Sekvence primerů byly syntetizovány v programu firmy Proligo; SIGMA ALDRICH s.r.o., ve spolupráci s firmou Biogen Praha, s.r.o.

Tab. 32: Dvojice primerů použitá pro detekci přítomnosti tiché bodové mutace

forvard primer	5'- GAGGAAATCGGCTGGCGCAATG -3'
reverse primer	5'- GTCATTGGGGGTGAGGATG -3'

Požadované úseky DNA, PCR amplifikáty o délce 108 bp, byly získány na termálních cyklerech Biometra Termogradient pro každé z 93 zvířat.

Složení Master mixů a teplotních poměrů v procesu PCR je výsledkem naší optimalizace metodiky laboratorních postupů (tab. 33–34).

Tab. 33: Složení PCR Master mixu – pro amplifikáty - ke genotypizaci tiché mutace

DNA plemeno skotu	PCR pufr	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Primery		DNA	* Ředěná Taq DNA polymeráza	H <sub>2</sub> O	mix celkem
	μl	μl	μl	Forw. μl	Rev. μl	μl	μl	μl	μl
holštýnský	2,5	2,8	0,8	2,5	2,5	1	3	9,9	25
český strakatý	2,5	2,7	0,8	2,4	2,4	1	3	10,2	25

Tab. 34: Optimalizované podmínky pro PCR na termocykleru Biometra Termogradient

Plemeno holštýn	Plemeno český strakatý skot	
Teplota /čas	Teplota /čas	Poznámka
104 °C		Předehřátí víčka
95 °C /10 min.	95 °C /10 min.	Predenaturace (po 5 minutách přidavek ředěné Taq DNA polymerázy)
95 °C /40 s	95 °C /40 s	Fáze jednoho cyklu: denaturace, annealing, elongace celkem 34 cyklů
64 °C /40 s	64,5 °C /40 s	
72 °C /30 s	72 °C /30 s	
72 °C /30 min.	72 °C /30 min.	Finální elongace
4 °C	4 °C	Uchováno při teplotě



Kvalita PCR amplifikátů je ověřována metodou ELFO na 2,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm.

Pro detekci přítomnosti TM byla určena restriční endonukleáza třídy II *SatI* (*Fnu4HI*), detekující úsek 5'-GC↓NGC-3'. Inkubace PCR amplifikátu restriční endonukleázou při 37 °C po dobu 12 hodin. Detekce výskytu cílových sekvencí metodou ELFO na 3,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Genotypizace na UV transiluminátoru při vlnové délce 312 nm, odečet přibližných velikostí vzniklých restričních fragmentů - porovnáním s komerčními velikostními markery pUC19 DNA/*MspI*, Marker 23 a Gene Ruler 100 bp DNA ladder a nerestrigovanými PCR amplifikáty.

Pro vyhodnocování genotypizace TM (CZARNIK et al., 2007a) je použito následné označení: homozygotní jedinci nemající tichou bodovou mutaci *CC*, restriční fragmenty 77+31 bp, homozygotní jedinci s tichou bodovou mutací *TT*, PCR amplifikáty bez restriční sekvence 108 bp, jedinci heterozygotní s jednou alelou s tichou bodovou mutací *CT*, PCR amplifikáty bez restriční sekvence 108 bp + restriční fragmenty 77+31 bp.

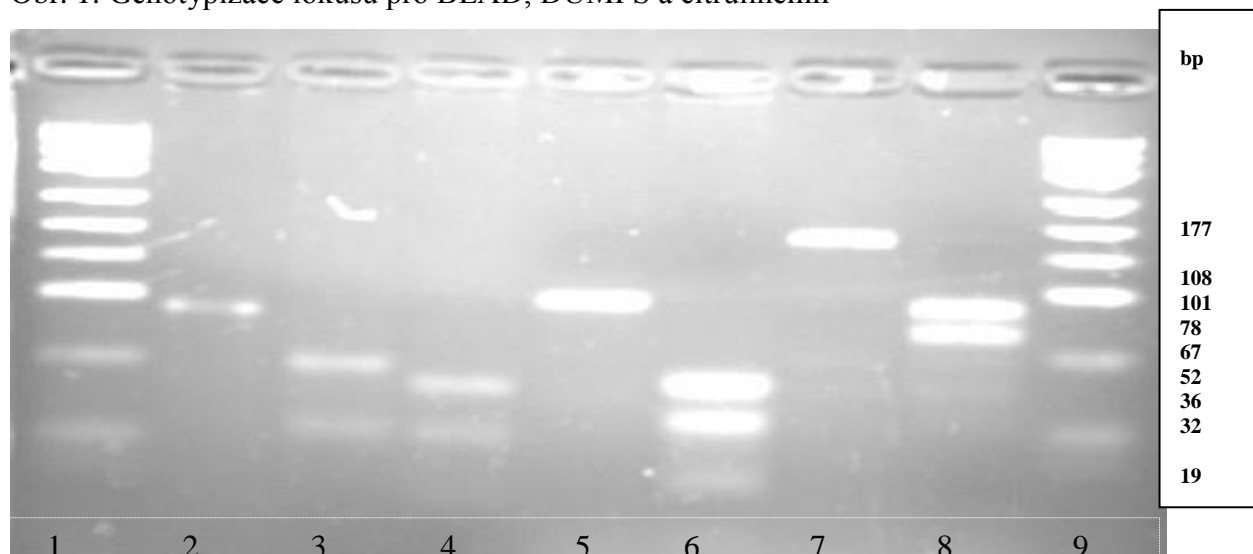
## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1 Analýza výskytu vybraných monogenních defektů a diskuse

#### 5.1.1 BLAD

V analyzovaném panelu tvořeném 406 býky a 161 plemenicemi holštýnského plemene, 146 býky českého strakatého skotu a 30 býky několika masných plemen u lokusu *ITGB2* genotypizovaného na BLAD nebyl genotypizován heterozygotní přenašeč recesivní alely onemocnění. Rovněž nebyl genotypizován žádný heterozygot u skupiny v zahraničí využívaných zvířat, 17 býků slovenského strakatého plemene, 3 býků holštýnského plemene používaného na Slovensku a 12 holštýnských býků využívaných v Polsku.

Obr. 1: Genotypizace lokusů pro BLAD, DUMPS a citrulinémií



Legenda: 1. velikostní marker pUC19 DNA/*Hae*III, 2. PCR produkt BLAD (101 bp), 3. RFLP *Hae*III BLAD (TL)(65+36 bp), 4. RFLP *Taq*I BLAD (TL) (52+32+19 bp), 5. PCR produkt DUMPS (108 pb), 6. RFLP DUMPS (TD) (53+36+19 bp), 7. PCR produkt – citrulinémie (177 bp), 8. RFLP citrulinémie – dominantní homozygot (99+78 bp), 9. velikostní marker pUC19 DNA/*Hae*III

Než porovnáme námi zjištěné výsledky, je nutno připomenout, že počátek 90. let byl obdobím výrazného zvyšování stavů holštýnského skotu v ČR v souvislosti s dovozem plemenného materiálu. S tím souvisí i vyšší výskyt skrytých heterozygotních nositelů i nositelek BLAD, ale také CVM, tehdy ještě nerozpoznaných dědičných onemocnění. Jednu z prvních informací o zdravotním stavu holštýnského skotu v ČR v 90. letech vzhledem k tomuto onemocnění uvádí HRADIL (1994), který genotypizací 377 býků zjistil status BL u 65 jedinců a z 61 testovaných krav u 4 jedinců, tj. 17 % resp. 6,5 %. Tento autor rovněž uvádí, že našel v populaci červeně zbarveného holštýna, používaného k zušlechtění českého strakatého skotu, z 64 genotypizovaných býků 34 BL pozitivních po jednom importovaném otci.

Tento nepříznivý stav byl v souladu s tehdejší situací ve světě. SHUSTER ET AL. (1992b) uvádí frekvenci nositelů onemocnění u US holštýnských býků 14,1 % a 5,8 % u krav. JØRGENSEN et al. (1993) uvádí u dánských plemenných býků výskyt heterozygotů 26,7 %. V Polsku první odhady výskytu BLAD nositelů u holštýnsko-fríského skotu zjišťoval GRZYBOWSKI et al. (1994), u krav uvádí frekvenci mutantní alely 8 % a u mladých býků 15 %.

Námi zjištěný výsledek nulového výskytu nositelů BLAD koresponduje s údaji screeningu, který je prováděn ČMSCH, a.s. od r. 1993 (tab. 35). Dle sdělení laboratoře

ČMSCH, a.s. bylo v letech 1993–2005 na BLAD genotypizováno celkem 1238 býků a 158 jalovic. Frekvence zachycených BL jedinců nejen u nás, ale i celosvětově, má příznivou klesající tendenci a podle informace ČMSCH, a.s. nebyl v letech 2007–2014 zachycen žádný nový případ BL jedince, přičemž např. v letech 2008–2010 bylo ročně vyšetřeno 60–80 mladých býků. V posledních letech laboratoř již provádí minimální množství vyšetření zvířat na toto postižení. Plemeníci, pokud jsou dováženi, bývají již převážně genotypizováni v zahraničí.

Tab. 35: Frekvence počtů heterozygotních nositelů alely pro BLAD (status BL) zjištěných genotypizací v jednotlivých letech v ČR laboratoři ČMSCH, a.s. (ústní sdělení vedoucí laboratoře)

Rok testace	Býci		Jalovice		Celkem % výskyt BL jedinců z testovaných
	Celkem testováno jedinců	Počet BL jedinců a (%) z testovaných	Celkem testováno jedinců	Počet BL jedinců a (%) z testovaných	
2005	101	1 (1 %)	8	0	0,9
2004	161	3 (2 %)	10	2 (20 %)	2,9
2003	153	0	9	2 (20 %)	1,2
2002	89	2 (2 %)	9	2 (20 %)	4,1
2001	83*	2 (2 %)	- *	0	2,4
2000	69*	1 (1 %)	- *	3	5,8
1999	14	0	2	0	0
1993–98	568	79 (14 %)	121	13 (11 %)	13,4

\* pohlaví nerozlišováno

V případě BLAD je příznivý trend důsledkem mezinárodně přijatých opatření zavedených v 90. letech 20. století na doporučení organizací WHFF – World Holstein Friesian Federation a EHRC – European Holstein and Redholstein Confederation po velkém rozšíření choroby v 80.– 90. letech (americký kontinent, Evropa) v populaci holštýnského plemene a její identifikaci. K opatřením patří zejména vyhledávání skrytých heterozygotních nositelů onemocnění mezi plemennými zvířaty, jejich evidence a následná eliminace z plemnitby.

Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR rovněž na základě doporučení mezinárodních organizací (WHFF a EHRC) vydal metodiku s názvem Opatření k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR s platností od 1. 1. 2004 (příloha č. 2).

Býci, kteří již byli zařazeni do plemenitby a byl u nich dodatečně zjištěn status BL, mají tento status vyznačen a jejich využívání je striktně omezeno. Mladí býci musí být genotypizováni s negativním výsledkem, nebo musí být negativní oba rodiče. Pokud se inseminuje dávkami býků, kteří jsou nositeli vady, musí jít pouze o prověřené plemeníky a chovatel musí být o této skutečnosti informován. Mělo by se zabránit připarování BL býků na podezřelé plemenice z hlediska původu, tj. s nezjištěným statutem. Pokud se používají v přirozené plemenitbě býci neznámého statusu, je prodávající povinen zajistit jejich testování (ADAMOVI, 2004).

Českomoravská společnost chovatelů (ČMSCH) uvádí na svých internetových stránkách (ČMSCH, 2011) celkem 64 plemenných býků nositelů BLAD, jejichž dcery nemohou být vybírány jako matky pro odchov plemenných býků. Tito býci jsou zařazeni do zdravotní třídy C (prakticky vyřazeni z plemenitby), celkem 35 náleží plemeni holštýn, např. býci z linie NGA 15x, NX 11x, NEB 6x, NOM 2x, NBY 1x a 29 plemeni český strakatý skot. Výskyt tohoto onemocnění u jedinců českého strakatého skotu souvisí zřejmě s přítomností holštýnského předka červené barvy, kteří byli a jsou používáni k zušlechťovacímu křížení s českým strakatým skotem. Při zpracování této práce byla provedena analýza rodokmenů BL býků českého strakatého skotu. V jejich rodokmenu byl nalezen např. Bardine I Hitit Rich, USA 1599010, 1962, který byl podle databáze Plemdat, s.r.o. vnukem původního šířitele onemocnění Osborndale Ivanhoe. Přenašeči jsou dle této databáze někteří býci z linie RSI (27 jedinců) a býci HT 014, KV 166. Heterozygotní býci českého strakatého skotu byli narozeni v letech 1988–1992 a holštýnského plemene v období 1976–1991.

### **5.1.2 DUMPS**

Výsledek, kdy nebyl screeningem holštýnského skotu genotypizován heterozygotní přenašeč onemocnění DUMPS, není nijak ojedinělým, neboť obecně výskyt tohoto defektu v populaci skotu je nižší než například u BLAD a CVM. Neprokázaný výskyt tohoto dědičného onemocnění u zástupců dalších plemen rovněž nebyl překvapivý, neboť literární prameny neodkazují na výskyt tohoto onemocnění u jiných plemen skotu.

Podobný výsledek uvádí například KAMINSKI et al. (2005) v Polsku, kam byl od 70. let z USA a Kanady dovážen plemenný materiál, kdy mezi 2209 genotypizovanými holštýnskými plemennými býky zařazenými v šlechtitelském programu v období 1999–2003 nebyl zjištěn

žádný přenašeč DUMPS. MEYDAN et al. (2010) uvádí ve výsledcích náhodného screeningu 350 holštýnských krav dovezených na jatka v období let 2007 až 2009 ze dvou oblastí Turecka, že nebyl zachycen žádný případ přenašečky onemocnění DUMPS. Rovněž PATEL et al. (2006) uvádí, že u 642 indických holštýnských krav a holštýnských kříženek nebyla zjištěna žádná přenašečka onemocnění DUMPS.

To, že situace v holštýnské populaci skotu v USA byla v 80. letech vzhledem k výskytu DUMPS závažnější, dokládají výsledky z výzkumu SHANKSE et al. (1984), který uvádí, že 2 % populace holštýnského skotu je nositelem postižení. ROBINSON et al. (1993b) poukazuje na výsledky testování holštýnské populace v Severní Americe v letech 1988–1991, kdy bylo testováno 3461 jedinců a bylo zjištěno 585 heterozygotů, v téže době proběhlo rovněž testování 1226 zvířat v Evropě, kde bylo identifikováno 414 heterozygotních nositelů. Testování bylo počátkem ozdravného procesu, který iniciovala Holstein Association of America, kdy r. 1987 bylo DUMPS prohlášeno za nežádoucí vadu.

Příkladem situace 90. let je výskyt onemocnění v argentinských chovech (POLI et al., 1996), kdy byla zjištěna u 104 býků frekvence recesivní alely 0,96 % a u krav 0,11 %, celkem bylo prověřeno 104 býci a 950 krav.

VANRADEN et al. (2011) uvádí, že v současnosti je průměrná frekvence nositelů DUMPS v celé holštýnské populaci 0,01 %.

Z těchto informací lze vyvodit závěr, že se situace v populaci holštýnského skotu z hlediska výskytu nositelů DUMPS obecně výrazně zlepšila vlivem různě intenzivně uplatňovaných opatření pro eliminaci onemocnění. Přesto by měla být populace tohoto plemene nadále sledována, protože jsou ve světě stále ještě oblasti a chovy, kde lze ještě výskyt DUMPS detekovat. Příkladem může být nález jednoho pozitivního holštýnského býka ze screeningu 86 býků pocházejících z různých indických oblastí a chovů (GAUR et al., 2013).

### **5.1.3 Citrulinémie**

Mezi genotypizovanými zvířaty nebyl zjištěn žádný případ nositele alely pro citrulinémií, nejen u holštýnského plemene, ale rovněž i dalších analyzovaných plemen. Tento výsledek je v souladu s výsledky jiných autorů.

Například v 90. letech v USA byl zjištěn relativně nízký výskyt heterozygotních nositelů onemocnění, ROBINSON et al. (1993a) uvádí údaj 0,3 %, kdy mezi 367 holštýnskými

býky byl nalezen pouze jeden případ. Dále prověřoval 102 býků plemene guernsey a 53 býků plemene jersey, aniž byl nalezen pozitivní přenašeč citrulinémie. Výsledek vyšetření 866 holštýnských býků v Německu v roce 1994 nepotvrdil výskyt přenašečů citrulinémie (GRUPE et al., 1996).

PATEL et al. (2006) genotypizací 642 indických holštýnských krav a holštýnských kříženek nezjistil žádnou heterozygotní přenašečku onemocnění citrulinémie. MEYDAN et al. (2010) uvádí ve výsledcích náhodného screeningu 350 holštýnských krav dovezených na jatka v období let 2007 až 2009 ze dvou oblastí Turecka, že nebyl zachycen žádný případ přenašečky onemocnění citrulinémie. LI et al. (2011) cituje jeden případ genotypizace heterozygota z vyšetření 179 čínských býků a 436 krav, tj. 0,16 %.

Tyto výše uvedené výsledky dokumentují, že se celosvětová situace ve výskytu citrulinémie u holštýnské populace v prvním desetiletí 21. století nijak výrazně nezhoršila.

#### **5.1.4 CVM**

Genotypizací 161 elitních holštýnských plemenic vybraných do panelu v letech 2003–2007 bylo zjištěno 32 skrytých heterozygotních nositelek onemocnění (CV), zbývajících 129 plemenic byly zdravé homozygotky dominantní (TV). Frekvence heterozygotních jedinců byla 19,9 % a relativní frekvence recesivní alely v přežívající části populace byla 9,9 %. Výskyt CV jedinců mezi elitními plemenicemi lze vyhodnotit jako poměrně vysoký.

Je nutno zdůraznit, že uvedená genotypizovaná zvířata nebyla vybrána náhodně, ale cíleně dle znalosti původu a s předpokladem možné vyšší pravděpodobnosti výskytu CV jedinců.

V ČR jsou testováni zejména plemenní býci holštýnského skotu na CVM, a to od roku 2002. Dle údajů laboratoře ČMSCH (2005) bylo na její podnět nejprve v zahraničí vyšetřeno v letech 2002–2004 celkem 260 zvířat, z toho bylo 33 CV pozitivních, což činí 12,7 % přenašečů.

ČMSCH (2004) zveřejnila informaci, že k 31.5.2004 je známa genotypizace na CVM celkem 1366 plemenných býků registrovaných v ČR pro inseminaci, z toho je 126 heterozygotních CV nositelů t.j. 9,2 %. Tento údaj byl relativně nízký ve srovnání s údaji publikovanými NAAB HOLSTEIN ASSOCIATION USA (2001), kdy v době publikování zprávy bylo nejméně 15 % top holštýnsko-fríských býků v USA nositeli CVM.

Nižší výskyt CV býků nelze podceňovat vzhledem k jejich většímu vlivu na populaci vlivem umělé inseminace.

Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR vydal metodiku s názvem Opatření k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR s platností od 1. 1. 2004 (příloha č. 2).

Býci, kteří byli zařazeni do plemenitby před rokem 2004 a u nichž byl dodatečně zjištěn status CV - v některých chovatelsky vyspělých zemích je zjišťován od roku 2002, mají tento status vyznačen v chovatelské dokumentaci a jejich využívání je omezeno. Přesto nejsou úplně vyloučeni z chovu. Mladí býci musí být genotypizováni s negativním výsledkem, nebo musí být negativní oba rodiče. Pokud se inseminuje dávkami býků, kteří jsou nositeli těchto vad, musí jít pouze o prověřené plemeníky a chovatel musí být o této skutečnosti informován. Mělo by se zabránit připařování CV býků na z hlediska původu podezřelé plemence s nezjištěným statutem. Pokud se používají v přirozené plemenitbě býci s neznámým statutem, je prodávající povinen zajistit testování (ADAMOVÁ, 2004). Tato skutečnost je příčinou toho, že v předkládané analýze byla zjištěna poměrně vysoká četnost heterozygotních přenašečů recesivní alely, jak u plemenic, tak u býků.

Dovoz plemenného materiálu v 90. letech byl příčinou výrazného nárůstu populace holštýnského skotu v ČR, zároveň tím docházelo i k šíření tohoto postižení, tehdy ještě nerozpoznaného, také do našich chovů.

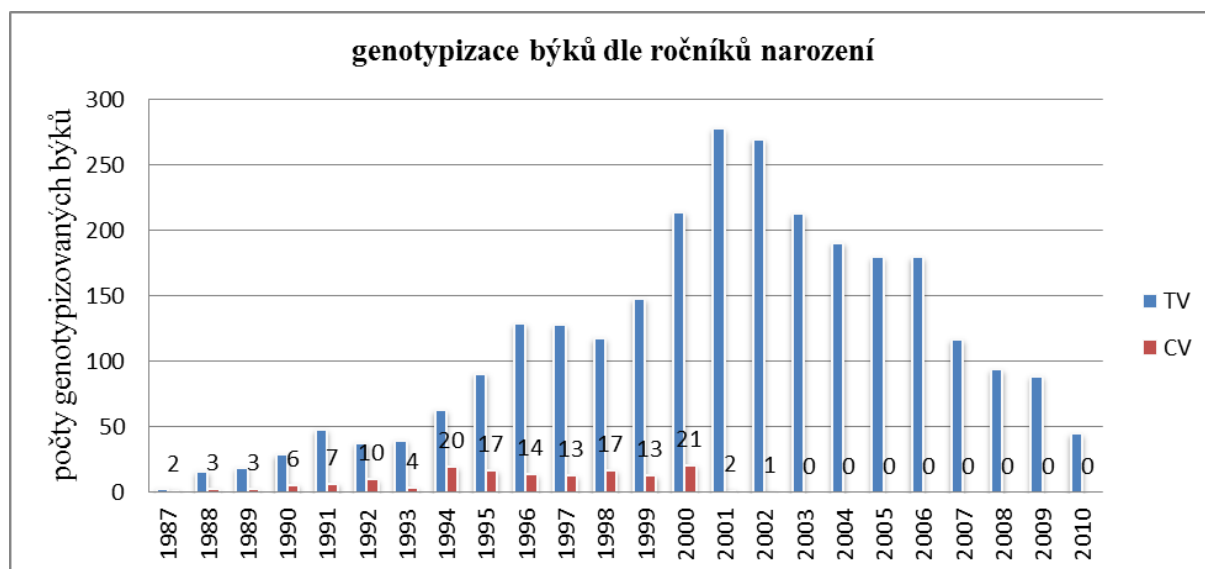
SCHHS ČR (2009) uvádí na svých webových stránkách databázi s názvem „Býci se známým statutem pro CVM – registrovaní“. Pokusili jsme se vyhodnotit některé údaje z této databáze. Zde uvedení býci jsou narozeni zejména v období 1988–2010 s výjimkou několika jednotlivých kusů z let 1979 až 1987 a jednoho kusu z roku 2011. Z 2919 zde uvedených holštýnských býků je evidováno celkem 157 býků (5,4 %) se statutem CV, ostatní mají uveden status TV.

CV býci jsou narozeni v letech 1980, 1982, 1984, 1986–2002, mladší býci již nevykazují dle této databáze status CV, ale pouze TV (graf.1).

Největší počty CV býků byly shledány pro ročníky narození 1994–2000, kdy počet CV býků v ročníku byl 13 až 21 kusů. Nejpočetnější výskyt CV býků byl zjištěn u ročníku narození 1994, 20 kusů, což je 24 % jedinců z celkově genotypizovaných v tomto ročníku a u ročníku 2000, 21 kusů, což je 8,9 %. Tito CV býci pochází z několika linií: NGA 69x, NX 25x, NEB 24x, NXA 18x, NBY 11x, NEA 7x, RED 2x, NUN 1x. Původ těchto CV býků je rozmanitý: 31 býků z ČR (což je 19,7 % z CV), 41 z USA, 35 z Francie, 22 z Nizozemí, 18 z Německa, 5 z Itálie, 2 ze Španělska, 2 z Belgie, 1 z Velké Británie.

Z databáze vyplývá, že nejvíce genotypizací, 1711 (59 %), bylo provedeno u býků s ročníkem narození 1999 až 2006, z toho nejvíce pro ročníky 2001, 280 býků a 2002, 271 býků (graf. 1).

Graf. 1: Poměr genotypizací TV a CV býků, dle ročníku narození (sestaveno z Databáze Svazu chovatelů holštýnského skotu ČR)



Z grafu č. 1 vyplývá, že býk narozený po roce 2003 se zjištěným statusem CV se již běžně nezařazoval do plemnitby. Je to výsledek přijatých opatření k omezení výskytu CVM ve světě od roku 2002 a v ČR v roce 2004, zejména zavedení povinné genotypizace heterozygotních nositelů onemocnění.

Obdobný trend uvádí ve své zprávě RUŠC et al. (2013), popisuje vývoj postižení CVM v populaci holštýnského skotu v Polsku, kde je od roku 2002 uplatňován program eliminace přenašečů CVM. Testace proběhla v období 2001–2012, celkově bylo prověřeno 1823 plemeníků narozených mezi lety 1991–2012. Za přenašeče CVM bylo označeno 303 býků (16,62 %). Zřetelný pokles přenašečů byl zaznamenán u býků narozených roku 2004 a od roku narození 2006 mají přenašeči nulový výskyt.

V ČR povinné testování nadále pokračuje. Na základě zveřejněných údajů bylo laboratoří imunogenetiky ČMSCH, a.s. v letech 2005–2011 provedeno u skotu 685 testů CVM, mezi nimiž bylo odhaleno 101 CV přenašečů, což činí 14,7 %. Počty vyšetřených zvířat cca od r. 2010 výrazně klesají, neboť populace holštýnského skotu je značně prověřena, zejména plemenci a čistokrevné elitní plemence z chovatelsky vyspělých zemí.



Další testování na CVM je nezbytné, protože v samičí populaci je výskyt recesivní alely dosud vyšší než u býků. I při používání výhradně homozygotně dominantních býků klesá frekvence recesivní alely v populaci v každé generaci pouze na jednu polovinu, proto je žádoucí využívat býky s potvrzeným statusem TV.

### 5.1.5 GSD V

Myopatie skotu jsou obecně významnou příčinou výrobních ztrát. Přesná diagnostika a léčba těchto myopatií je často problematická, protože příznaky nebývají jednoznačně charakterizovány, včetně variabilních příčin. Obecně je u skotu uváděno cca 5 primárních příčin. Vzhledem k nedostatku specifických diagnostických testů pro myopatie skotu mnoho případů postižených jedinců není správně diagnostikováno a léčba se omezuje na dávkování doplňků se selenem a vitamínem E, případně podáváním antibiotik (BILSTROM et al., 1998).

Rozvoj molekulárně genetických testů tuto situaci ohledně upřesnění některých diagnóz značně usnadňuje.

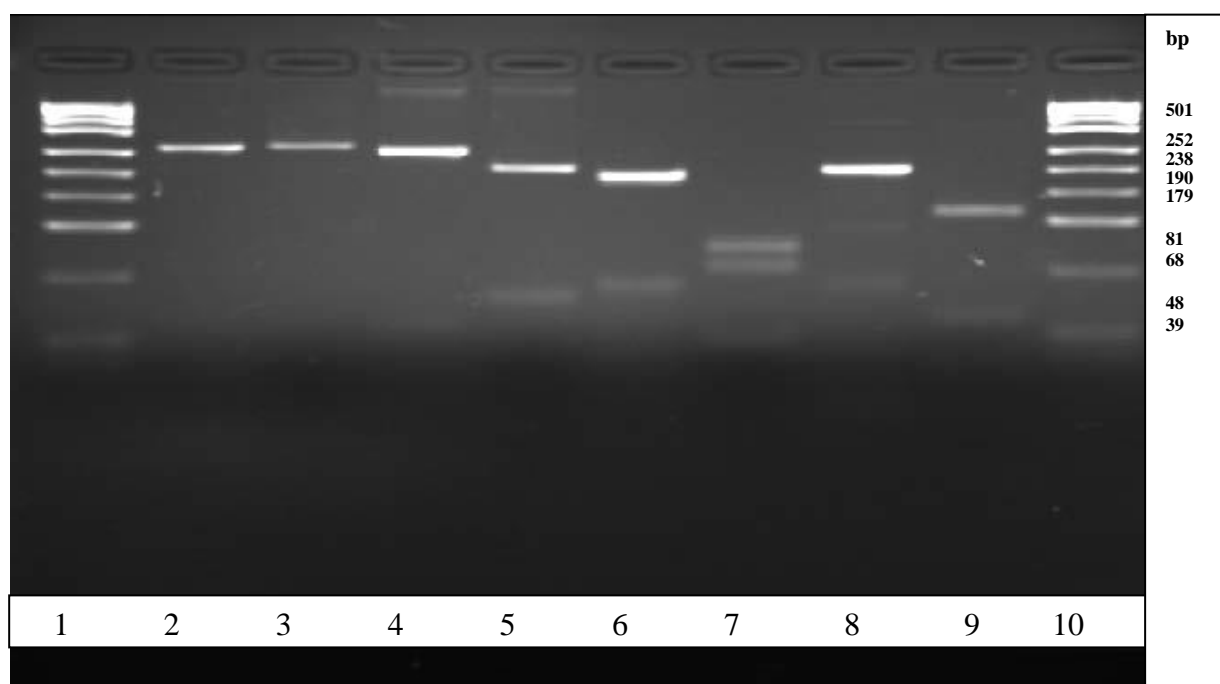
Genotypizací 113 jedinců na GSD V vybraných plemen chovaných v ČR, a to českého strakatého skotu ( $n = 62$ ), charolais ( $n = 34$ ), limousine ( $n = 4$ ), masného simentálu ( $n = 2$ ), blonde d'Aquitaine ( $n = 4$ ), belgického modrobílého ( $n = 6$ ) a aberdeen angus ( $n = 1$ ), nebyl zaznamenán žádný výskyt nemocného jedince či heterozygotního nositele recesivní alely tohoto onemocnění (obr. 2).

Tento výsledek rovněž potvrdil skutečnost, že onemocnění se týká zejména masného plemene charolais, případně jeho kříženců, protože nositel mutantní alely nebyl nalezen ani u příslušníků jiných plemen.

Podobné výsledky jako u nás byly zjištěny v Turecku, kdy nebyl ve zkoumaném panelu 125 zvířat nalezen žádný jedinec s alelou pro GSD V. Zvířata patřila k plemeni charolais, křížencům místních plemen s tímto plemenem (AKYŮZ et al., 2008).

Výsledky genotypizací tohoto onemocnění v 90. letech s vyšším výskytem uvádí ANGELOS et al. (1995). Popisuje výskyt 6 případů onemocnění GSD V u příbuzných jedinců plemene charolais v USA. Zvířata byla diagnostikována na základě histochemické a biochemické analýzy aktivity fosforylázy v kosterní svalovině.

Obr. 2: Genotypizace lokusů pro GSD V a GSD II.



Legenda: 1. velikostní marker pUC19 DNA/*Msp*I, 2. PCR produkt GSD V (252 bp), 3. RFLP GSD V - dominantní homozygot (252 bp), 4. PCR produkt GSD II E7 (238 bp), 5. RFLP GSD II E7 - dominantní homozygot (190 + 48 bp), 6. PCR produkt GSD II E9 (179 bp), 7. RFLP GSD II E9 - dominantní homozygot (81+68+30), 8. PCR produkt GSD II E13 (192 bp), 9. RFLP GSD II E13- dominantní homozygot (116+39+22+15 bp), 10. marker pUC19 DNA/*Msp*I

Rovněž BILSTROM et al. (1998) zveřejnil další případy výskytu u plemene charolais, včetně důkazů způsobu přenosu z předků na potomky, získaných studiem rozsáhlých rodokmenů postižených jedinců ve stádě. Příbuznost zvířat byla potvrzena antigenními testy krevních skupin. Zároveň v této práci je publikován test pro genotypizaci alel onemocnění pro plemeno charolais a příbuzná plemena. Dle BILSTROM et al. (1998) u prvního stáda bylo vybráno a prověřeno 48 dospělých zvířat a 233 telat, u dalších dvou stád 3 zvířata. Z dospělých zvířat prvního stáda bylo genotypizováno 25 homozygotů dominantních zdravých, 14 heterozygotů a 9 klinicky postižených homozygotů recesivních. Studiem rodokmenů těchto 9 postižených jedinců bylo prokázáno, že 8 jich mělo společného heterozygotního vzdáleného předka. U ostatních dvou stád byla tři vybraná zvířata potvrzena jako heterozygotní. V prvním stádě z 233 telat narozených roku 1994 bylo 185 homozygotů dominantních a 48 heterozygotů, homozygot recesivní přímo potvrzen nebyl. Frekvence dominantní alely byla  $0,891 \pm 0,044$  a alely mutantní  $0,109 \pm 0,015$ . U 60 jedinců plemene piemontese a 34 jedinců plemene salers nebyl shledán žádný nositel alely postižení.

Několik GSD V postižených jedinců plemene charolais z Nového Zélandu uvádí JOHNSTONE et al. (2004). Případy GSD V byly zaznamenány v Holandsku u kříženců plemene blonde d'Aquitaine (SOETHOUT et al., 2002).

### 5.1.6 GSD II

Genotypizací na GSD II stejného panelu jedinců (jako u GSD V), to je 113 jedinců plemen: českého strakatého skotu, charolais, limousine, masného simentálu, blonde d'Aquitaine, belgické modrobílé, aberdeen angus, v exonech 7, 9 a 13 genu nebyl zjištěn žádný heterozygotní ani homozygotně recesivní nositel mutace, všechna genotypizovaná zvířata byla shledána jako zdraví homozygoti dominantní (obr. 2).

Náš výsledek nevyvrátil skutečnost, že mutace v těchto exonech genu se týká zejména brahmanského skotu, případně jeho kříženců. Výskyt recesivní alely v těchto exonech v populacích jiných plemen nebyl zaznamenán.

GSD II byla popsána nejprve u masného australského shorthornského skotu (RICHARDS et al., 1977) a později u brahmanského skotu v Austrálii (O'SULLIVAN et al., 1981). S rozvojem molekulární genetiky se zjistilo, že místa v genu a molekulární příčiny onemocnění se u obou plemen liší.

DENNIS et al. (2002) genotypizací nositelů GSD II z let 1994–1996, brahmanského skotu dovezeného do Austrálie z USA, uvádí tyto údaje: z 3559 klinicky normálních zvířat bylo 18 % heterozygotů pro mutaci na E7, pro mutaci na E9 15 %, pro mutaci na E13 0,4 % zvířat. Genotypizací prováděnou v letech 1996–2001 u 8529 klinicky normálních jedinců australského brahmanského skotu bylo zjištěno 16,4 % heterozygotů pro mutaci E7, u 600 náhodně vybraných brahmanů nebyla mutace E13 zjištěna, tato mutace však byla detekována u potomků jednoho dovezeného býka.

ZLOTOWSKI et al. (2005) popisuje výskyt GSD II, mutace c.1057\_1058delTA v exonu E7 u více telat po jednom plemeníkovi brahmanského plemene v Brazílii.

Celosvětově rozšířený brahmanský skot je plemenem zebu, které vzniklo v USA v 19. století hybridizací zejména čtyř původních forem zebu, pocházejících z indického subkontinentu, případně anglických plemen masného skotu (SAMBRAUS, 2006).

Brahmanský skot má odlišnější fylogenezi než například evropská plemena skotu, přesto nelze zcela vyloučit, že stejný typ mutace může být příčinou onemocnění GSD II i u jiných plemen skotu, proto jsme pro genotypizaci zvolili takto sestavený panel.

Například u shorthornského skotu byla zjištěna letální mutace, kdy delece dinukleotidu v exonu 18, c.2454\_2455delCA, u shorthornského skotu vede k frameshiftu a vzniku stop kodonu v exonu 19 v nukleotické pozici 2637–2639, tedy k předčasnému ukončení translace. Následkem je neaktivní peptid zkrácený o 60 aminokyselin (DENNIS et al., 2000, 2001). Tato mutace nebyla zjištěna u postiženého brahmanského skotu. DENNIS et al. (2001) uvádí odhad výskytu heterozygotů v populaci australského shorthornského skotu 4–5 %. U registrovaných býků uvádí odhad heterozygotů nad 0,9 %, kdy na základě genotypizace 218 plemeníků byli zjištěni 2 heterozygoti.

Ve druhé dekádě tohoto století nebyly zjištěny nově publikované údaje o vývoji rozšíření obou myopatických onemocnění GSD II a V u skotu ve světě. I z toho lze usoudit, že úroveň onemocnění v posledním desetiletí v populacích zasažených plemen není nijak závažná.

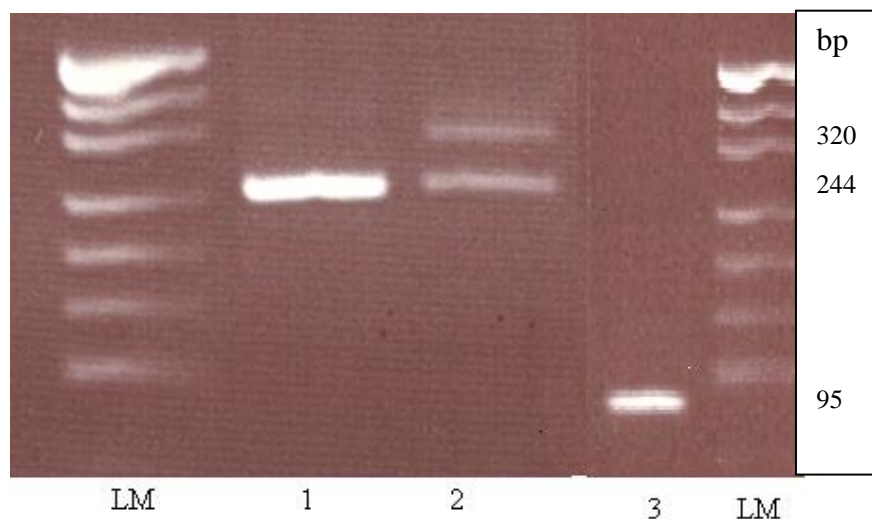
### **5.1.7 Deficience krevního koagulačního faktoru XI**

Exon 12 krevního koagulačního faktoru XI byl genotypizován u 309 zvířat, z toho 249 jedinců německého holštýna, 30 jedinců české populace holštýna, 30 jedinců českého strakatého skotu. V exonu 9 téhož genu bylo genotypizováno 152 jedinců, z toho 60 německých holštýnů, 40 jedinců české populace plemene holštýn, 52 příslušníků českého strakatého plemene. Byl zachycen pouze jeden případ heterozygotní nositelky této mutace, vyskytující se v exonu 12. Pozitivní nález byl u krávy německého holštýnského skotu, vzorky byly poskytnuty Leibniz-Institutem FBN v Dummerstorfu (obr. 3).

Ostatní prověřovaná zvířata bez rozdílu pohlaví, u české a německé skupiny holštýnského plemene a českého strakatého skotu, byla genotypizována v exonu 12 nebo 9 jako zdraví dominantní homozygoti. Genotypizace uvedených skupin zvířat tak nepotvrdila možnost zvýšeného výskytu tohoto dědičného onemocnění v české populaci holštýnského skotu a rovněž nezjistila jeho přítomnost ani u českého strakatého skotu. Nicméně výskyt ojedinělého případu heterozygota s frekvencí recesivní alely 0,2 % v panelu německého holštýnského skotu pro exon 12 znamená, že onemocnění je u tohoto plemene skotu stále přítomno, přestože bylo zjištěno jen v německé populaci.

Výsledek genotypizace potvrzuje sporadický výskyt této mutace v populaci holštýnského skotu. Například GHANEM et al. (2005) uvádí výskyt jednoho případu holštýnské heterozygotní nositelky deficitního krevního koagulačního faktoru v exonu 12 po vyšetření 40 krav z Hirošimské prefektury z deseti farem, tj. frekvence výskytu 2,5 %.

Obr. 3: PCR – genotypizace lokusu FXI, v exonech 12 a 9



Legenda: LM velikostní marker pUC19 DNA/*Msp*I; 1. exon 12, zdravý homozygot (244 bp), 2. exon 12 - heterozygotní přenašeč (320 + 244 bp), 3. exon 9 - zdravý homozygot (95 bp).

Podobné frekvence výskytu heterozygotních nositelů mutace v exonu 12 z populace holštýnského skotu jsou zjišťovány i v dalších oblastech, USA 1,2 % (MARRON et al., 2004), Indie 0,6 % (RAJESK et al., 2007), Turecko 1,8 % (MEYDAN et al., 2009). GENTRY et al. (1980) uvádí z výzkumu kanadské populace holštýnského skotu 70. let jeden z nejvyšších výskytů heterozygotů 12,4 %. GURGUL et al. (2009) testací náhodného výběru 140 krav holštýnského plemene v Polsku zjistil výskyt 3 heterozygotů, tj. 2,14 %.

Z literatury nebyl zjištěn případ jiného než holštýnského plemene skotu s tímto onemocněním v důsledku mutace v exonu 12. Ani u našeho českého strakatého skotu nebyli nalezeni jedinci s mutací na tomto exonu.

Japonští autoři uvádí výskyt deficitu faktoru XI u japonského černého skotu (wagyu), kde genetická příčina postižení v exonu 9 genu se poněkud liší od holštýnského skotu (KUNIEDA et al., 2005; WATANABE et al., 2006; OHBA et al., 2007). Z literárních zdrojů zatím nebylo zjištěno jiné plemeno, než japonský černý skot (wagyu) s genetickou příčinou onemocnění v exonu 9. To potvrzují i naše výsledky.

## 5.2 Výsledky restrikční analýzy části lokusu *ITGB2* (*CD18*)

### 5.2.1 Vyhodnocení výsledků restrikční analýzy části lokusu *ITGB2* (*CD18*) u holštýnských krav se statusem TL

Metodou PCR-RFLP bylo genotypizováno 210 skupin vzorků. Skupinu tvořilo 12 zvířat se statusem TL, jeden úsek genu ze stejné dvojice primerů, vždy po restrikci jednou endonukleázou. Každý úsek genu štěpený jednou restriktázou byl z hlediska výskytu restrikčních polymorfismů hodnocen samostatně. Dle metodiky byly samostatně vyhodnocovány vzorky DNA deseti zdravých holštýnských plemenic statusu TL a také vzorky dalších dvou kontrolních zvířat se statusem TL, která byla však vyhodnocována souběžně s jedinci BL. Takto bylo genotypizováno a vyhodnoceno 2520 vzorků.

Délky fragmentů byly odhadnuty srovnáním s velikostním markerem. S ohledem na rozsah prováděné studie nebyly zjišťovány exaktní fragmentovou analýzou, protože takové zjištění by bylo ekonomicky nákladné.

U zdravých holštýnských plemenic statusu TL bylo uvedenou metodou ve zkoumané části lokusu *CD18* o velikosti 11203 bp DNA detekováno celkem 12 polymorfních míst (tab. 37, obr. 4).

#### Diskuse k výsledkům.

Z celkových 210 skupin vzorků bylo zaznamenáno u 12 skupin (5,7 %) (tab. 37) rozdílné restrikční štěpení ve skupině, tzn. polymorfní místo, případně heterozygotní uspořádání u jednotlivců. U ostatních skupin nebyly zjištěny odchylky vztahující se k polymorfismu. Polymorfismy byly postupně odkryty pomocí čtyř RE: *TaqI*, *AvaI*, *StyI*, *MseI*. Části řetězců většinou pod 60 bp se ne vždy podařilo pomocí ELFO jednoznačně identifikovat, proto jsou vyznačeny v závorce.

Odchylky ve štěpení RE byly zaznamenány celkem u 11 úseků PCR amplifikátů (tab. 37). U jednoho úseku (č. 11) PCR amplifikátu byla zjištěna celkem 3 polymorfní místa účinkem dvou RE: *TaqI* a *AvaI* (tab. 37).

Z důvodu velkého překryvu dvojice úseků (č.17 a č.21) PCR amplifikátů a rovněž u dvojice úseků (č. 18 a č.19) (viz tab. 37), lze zjištěné polymorfismy na těchto úsecích u každé z dvojic, vzhledem k poloze a účinkem stejných typů RE (*StyI*; *AvaI*), považovat za totožné v rámci každé z dvojic (obr. 6).

U 93 skupin (44 %) nebyly zjištěny cílové sekvence pro některé RE (tab. 36).

Při prokazování polymorfního restrikčního místa pro danou RE je optimální variantou nález jedinců – reprezentantů každé ze tří variant restrikčních modelů: heterozygotního a dvou rozdílných typů homozygotních, modelová situace je na obr. 5. S dostatečným počtem vyšetřených jedinců se zvyšuje pravděpodobnost nalezení jedinců všech modelových variant v rámci daného polymorfismu. Tato situace byla zjištěna u amplifikátu č. 9, RE *MseI*; č.14, RE *StyI*; a amplifikátu č.17 a 21, RE *StyI* (tab. 37).

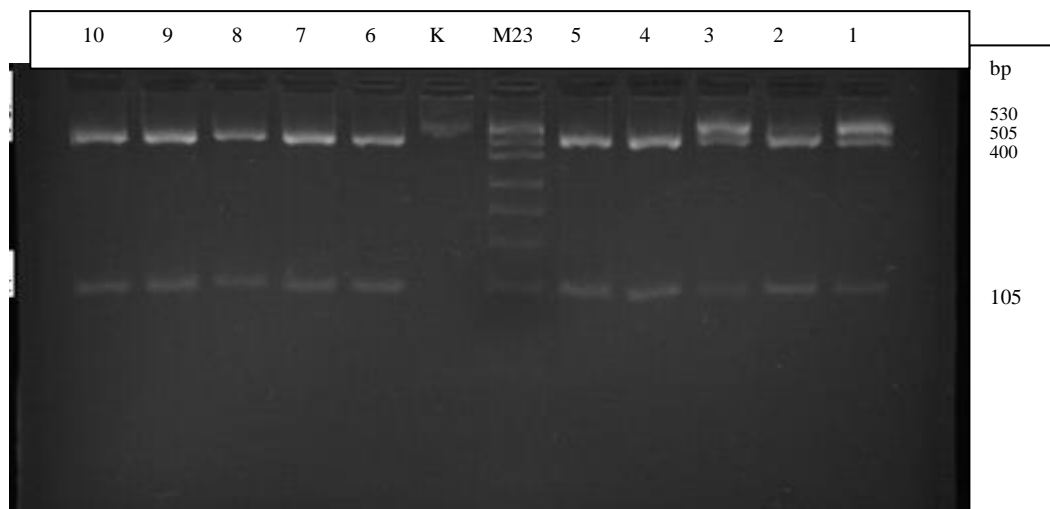
Ostatní uváděná polymorfní restrikční místa jsou odvozena zejména na základě přítomnosti heterozygotního modelu, který obsahuje neštěpený amplifikát a rozštěpený amplifikát s jedním specifickým restrikčním místem pro danou RE.

Výskyt nerozštěpených amplifikátů je způsoben nepřítomností restrikčního místa v genotypizovaném úseku DNA pro použitý typ RE.

Tab. 36: Souhrnné vyhodnocení přítomnosti cílových sekvencí RE.

Zjištěny cílové sekvence u všech skupin PCR amplifikátů; u RE	Zjištěny cílové sekvence jen u některých skupin PCR amplifikátů; u RE	Cílové sekvence nebyly zjištěny u žádné skupiny PCR amplifikátů u RE
<i>HaeIII, DdeI</i>	<i>StyI, AluI, AvaI, AvaII, MseI, TaqI</i>	<i>HindIII, ClaI</i>

Obr. 4: Příklad jednoho nalezeného restrikčního polymorfismu DNA, gel RFLP, PCR amplifikát č. 7 (530 bp), restrikce *TaqI*, vzorky č. 1 – 10,

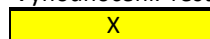


Legenda: K – amplifikát PCR 530 bp; M 23 – velikostní marker pUC19 DNA/*MspI*; vzorky č. 2, 4 – 10 homozygotní restrikční model:  $400 + 105 + (25)$  bp; vzorky č. 1, 3 heterozygotní restrikční model:  $505 + 400 + 105 + (25)$  bp;

Obr. 5: Modelové schéma genotypizace (PCR-RFLP) s použitím dané RE, identifikace polymorfního restrikčního místa (SNP) – na agarózovém gelu

zvíře	1	2	3	4	bp
PCR - amplifikáty					552
restrikční fragmenty					305
					247
LEGENDA:	negenotypizované PCR amplifikáty pro daný úsek zkoumaného lokusu	homozygotní model jedince s variantou PCR amplifikátů se specifickým restrikčním místem	homozygotní model jedince bez specifického restrikčního místa = neštěpený PCR amplifikát	heterozygotní model jedince s dvěma variantami PCR amplifikátů - jednou se specifickým restrikčním místem pro konkrétní RE a druhou bez specifického restrikčního místa	velikostní marker

Vyhodnocení: restrikční polymorfní místo (X) se v tomto případě shoduje s restrikčním místem dané RE





Tab. 37: Výčet úseků - čísel amplifikátů s restrikčním polymorfismem – zvířata status TL

Číslo amplifikátu; (Rozsah úseku)	Délky amplifikátu PCR (bp)	Délky restrikčních fragmentů – bp Restrikční modely (homozygotní, heterozygotní) (počet polymorfních míst)	RE
3. (936–1690)	754	<u>754</u> + <u>390</u> + <u>364</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, A)</b>	<i>TaqI</i>
7. (2064–2594)	530	<u>400</u> + <u>105</u> + (25) (homozygot) <u>505</u> + <u>400</u> + <u>105</u> + (25) (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, B)</b>	<i>TaqI</i>
8. (3097–3496)	399	<u>399</u> + <u>255</u> + <u>144</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, C)</b>	<i>TaqI</i>
9. (3438–4020)	582	<u>500</u> + <u>82</u> (homozygot) <u>500</u> + <u>82</u> + <u>100</u> + (482) (heterozygot) <b>(2 polymorfní místa, D, E)</b>	<i>MseI</i>
11. (9885–10437)	552	<u>305</u> + <u>247</u> (homozygot) <u>552</u> + <u>305</u> + <u>247</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, F)</b>	<i>TaqI</i>
		<u>280</u> + <u>160</u> + <u>112</u> (homozygot) <u>552</u> + <u>280</u> + <u>160</u> + <u>112</u> (heterozygot) <b>(2 polymorfní místa, G, H)</b>	<i>AvaI</i>
13. (7432–8148)	716	<u>385</u> + <u>331</u> (homozygot) <u>716</u> + <u>385</u> + <u>331</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, I)</b>	<i>TaqI</i>
14. (6369–7067)	698	<u>462</u> + <u>169</u> + (67) (homozygot) <u>362</u> + <u>100</u> + <u>169</u> + (67) (homozygot) <u>462</u> + <u>362</u> + <u>100</u> + <u>169</u> + (67) (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, J)</b>	<i>StyI</i>

Tab. 37: pokračování

Číslo amplifikátu; (Rozsah úseku)	Délky amplifikátů PCR (bp)	Délky restričních fragmentů – bp Restriční model (homozygotní, heterozygotní) (počet polymorfních míst)	RE
17. (4927–5569)	642	<u>445</u> + 170 + (27) (homozygot) <u>334 + 111</u> + 170 + (27) (homozygot) <u>445 + 334 + 111</u> + 170 + (27) (heterozygot) (1 polymorfní místo, L - totožné s místem na amplifikátu č. 21; překryv amplifikátů)	StyI
21. (4927–5618)	691	<u>445</u> + 170 + 76 (homozygot) <u>334 + 111</u> + 170 + 76 (homozygot) <u>445 + 334 + 111</u> + 170 + 76 (heterozygot) (1 polymorfní místo, L - totožné s místem na amplifikátu č. 17; překryv amplifikátů)	
Poznámka: Polymorfní místa detekovaná RE <i>StyI</i> na úseku č.17 a č.21, jsou do celkového výčtu vykazována společně, jako <b><u>jediné polymorfní místo, L</u></b> Důvodem je částečný překryv úseků.			
18. (4514–5131)	617	337 + <u>160 + 120</u> (homozygot) 337 + <u>280 + 160 + 120</u> (heterozygot) (1 polymorfní místo, N – totožné s místem na amplifikátu č.19; překryv amplifikátů)	AvaI
19. (4507–5244)	737	450 + <u>160 + 127</u> (homozygot) 450 + <u>287 + 160 + 127</u> (heterozygot) (1 polymorfní místo, N – totožné s místem na amplifikátu č.18; překryv amplifikátů)	
Poznámka: Polymorfní místa detekovaná RE <i>AvaI</i> na úseku č.18 a č.19, jsou do celkového výčtu vykazována společně, jako <b><u>jediné polymorfní místo, N</u></b> . Důvodem je částečný překryv úseků.			

## 5.2.2 Vyhodnocení výsledků restrikční analýzy části lokusu *ITGB2* (*CD18*)

### holštýnských krav se statutem BL včetně srovnání s výsledky zkoumaných zvířat se statutem TL

Podle již v textu uvedené metodiky bylo pro skupinu 5 zvířat se statutem BL a celkem 12 jedinců statusu TL vyhotoveno celkem 3570 vzorků.

Zvolenou metodou PCR-RFLP bylo u zvířat statusu BL zjištěno celkem 12 restrikčních polymorfních míst (tab. 38–39), z toho 10 míst je shodných se zvířaty se statutem TL (tab. 38). Zbývající dvě restrikční polymorfní místa byla zachycena pouze u zvířat statusu BL a naopak dvě restrikční polymorfní místa byla zachycena pouze u zvířat se statutem TL (tab. 39).

Celkově tak bylo u zvířat obou statusů BL a TL zjištěno 14 polymorfních míst (tab. 38–39) s pracovním označením A až N (obr. 6). Nejvyšší počet polymorfních míst, celkem 3, bylo nalezeno u úseku č.11 (9885–10437) při genotypizaci RE *TaqI*, *AvaI* (obr. 6).

#### Diskuse k výsledkům

Zjištěné čtyři rozdíly v restrikčních polymorfních místech mezi statusy BL a TL jsou uvedeny v tab. 39. Patrně shodou okolností to bylo zaznamenáno vždy pouze u restrikce *AvaI*.

Jedno restrikční polymorfní místo pouze pro zvířata statusu BL bylo zjištěno u amplifikátu č. 14 pro restrikční endonukleázu *AvaI*, kdy byl zaznamenán jeden homozygotní model bez restrikčního místa a heterozygotní restrikční model. U zvířat se statutem TL nebylo u amplifikátu č. 14 pro RE *AvaI* nalezeno restrikční polymorfní místo, byl zde zaznamenán pouze homozygotní model bez štěpného místa pro RE *AvaI*.

Při genotypizaci většího počtu zvířat nelze vyloučit možnost výskytu restrikčního polymorfního místa i u TL jedinců, pokud by zmíněný polymorfismus nijak nesouvisel se statutem BL.

Druhé restrikční polymorfní místo detekované opět pouze u zvířat statusu BL bylo genotypizováno RE *AvaI* se nachází u amplifikátů č. 17 a 21, protože se tyto úseky převážně překrývají, lze nalezená restrikční polymorfní místa považovat z hlediska polohy za shodná. U jedinců statusu BL, u amplifikátu č. 17 byl zjištěn jeden homozygotní model bez restrikčního místa a homozygotní restrikční model s restrikčním místem, u amplifikátu č. 21 byl zjištěn homozygotní model bez restrikčního místa a heterozygotní model. U jedinců statusu TL byl

nalezen pouze homozygotní model bez restričního místa pro RE *AvaI*, shodně u dvojice amplifikátů č.17 a 21.

Dvě restriční polymorfni místa byla naopak zjištěna pouze u jedinců statusu TL u amplifikátu č. 11, po genotypizaci RE *AvaI*, kdy byl zaznamenán heterozygotní restriční model a homozygotní restriční model se dvěma restričními místy.

U jedinců statusu BL u amplifikátu č. 11, po genotypizaci RE *AvaI*, byl zaznamenán pouze homozygotní restriční model se dvěma štěpnými místy. Rozdíl mezi statusy může být způsoben rovněž nízkým počtem vyšetřených zvířat se statutem BL.

U případů zvířat se statutem BL a s polymorfismem míst zjištěných jen pro tento status, zůstávají zvířata fenotypově zdravá (bez BLAD). Přímá souvislost s onemocněním BLAD v těchto případech nebyla zjištěna.

Zjištěné výsledky pravděpodobně zachycují stěžejní část polymorfismů, jejich nejfrekventovanější formu SNPs – single nukleotide polymorphisms - zachytitelnou zvolenými restričními endonukleázami třídy II. V genotypizovaném úseku nelze vyloučit výskyt i jiných polymorfismů, které vlivem zvolené metody nebo RE nebyly v této práci detekovány. Rovněž relativně nízký počet vyšetřovaných zvířat nemůže poskytnout úplný obraz výskytu polymorfismů ve vyšetřované části lokusu *CD18* v populaci holštýnského plemene.

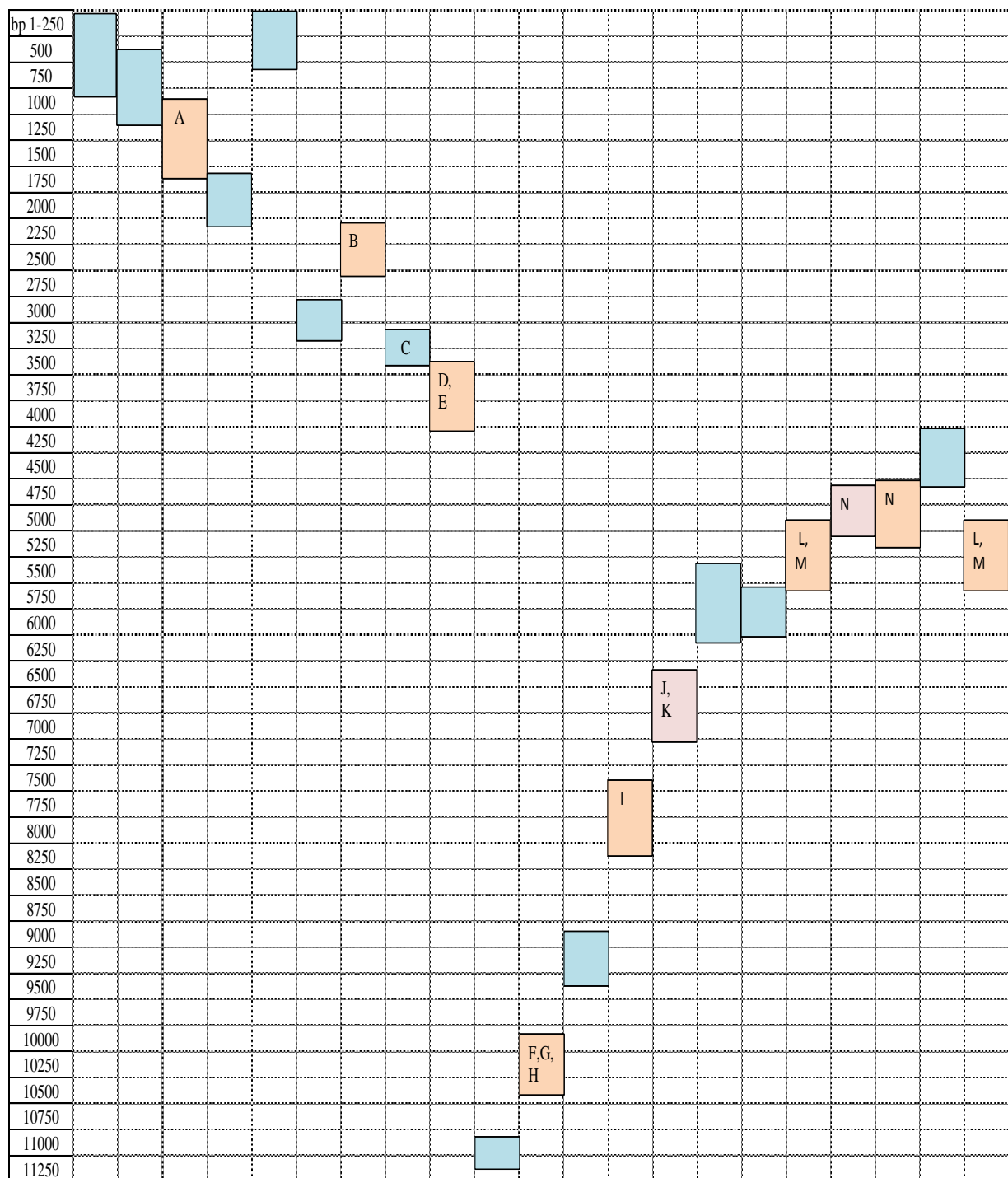
O nalezení podstatného množství polymorfních míst ve zkoumané části lokusu o velikosti 8725 bp můžeme usuzovat i na základě průměrné frekvence, která činila v průměru jedno polymorfni místo na cca 623 bp.

Například GIBBS et al. (2009) uvádí průměrnou hustotu 1 SNP na 714 bp u chromozómů holštýnského skotu i plemene angus, pro brahmanský skot 1 SNP na 285 bp.

Námi zjištěný údaj rovněž koresponduje s údaji CRAWFORDA et al. (2000), že dle odhadu jeden SNP se vyskytuje na každou kilobázi jedinečné lidské sekvence. FRAZER et al. (2007) uvádí v lidském genomu průměrnou hustotu 1 SNP na 875 párů bází. Ve skutečnosti je rozložení SNPs v genomech nerovnoměrné.

Obr. 6: Schéma polohy 21 úseků - PCR produktů pro restriční analýzu a polymorfních míst

č. úseku	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.
velikost bp	828	668	754	394	579	478	530	399	582	363	552	476	716	698	695	493	642	617	737	588	691
poloha úseku v lokusu bp	3 - 831	485 - 1153	936 - 1690	1671 - 2065	2 - 581	2758 - 3236	2064 - 2594	3097 - 3496	3438 - 4020	10840 - 11203	9885 - 10437	8988 - 9464	7432 - 8148	6369 - 7067	5392 - 6087	5553 - 6046	4927 - 5569	4514 - 5131	4507 - 5244	4002 - 4590	4927 - 5618



Legenda: ■ úseky bez zjištěného polymorfního místa      ■ seky s polymorfním místem.

Zjištěná polymorfní místa, zde označená A až N - včetně shodných míst (L, M, N)

Tab. 38: Výčet shodných polymorfních míst úseků pro status TL a BL

Číslo amplifikátu; (Rozsah úseku)	Délky amplifikátu PCR (bp)	Délky restričních fragmentů – bp Restriční modely (homozygotní, heterozygotní) (počet polymorfních míst)	RE
3. (936–1690)	754	<u>754</u> + <u>390</u> + <u>364</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, A)</b>	<i>TaqI</i>
7. (2064–2594)	530	<u>400</u> + <u>105</u> + (25) (homozygot) <u>505</u> + <u>400</u> + <u>105</u> + (25) (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, B)</b>	<i>TaqI</i>
8. (3097–3496)	399	<u>399</u> + <u>255</u> + <u>144</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, C)</b>	<i>TaqI</i>
9. (3438–4020)	582	<u>500</u> + <u>82</u> (homozygot) <u>500</u> + <u>82</u> + <u>100</u> + (482) (heterozygot) <b>(2 polymorfní místa, D, E)</b>	<i>MseI</i>
11. (9885–10437)	552	<u>305</u> + <u>247</u> (homozygot) <u>552</u> + <u>305</u> + <u>247</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, F)</b>	<i>TaqI</i>
13. (7432–8148)	716	<u>385</u> + <u>331</u> (homozygot) <u>716</u> + <u>385</u> + <u>331</u> (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, I)</b>	<i>TaqI</i>
14. (6369–7067)	698	<u>462</u> + <u>169</u> + (67) (homozygot) <u>362</u> + <u>100</u> + <u>169</u> + (67) (homozygot) <u>462</u> + <u>362</u> + <u>100</u> + <u>169</u> + (67) (heterozygot) <b>(1 polymorfní místo, J)</b>	<i>StyI</i>

Tab. 38: pokračování

Číslo amplifikátu; (Rozsah úseku)	Délky amplifikátů PCR (bp)	Délky restrikčních fragmentů – bp Restrikční model (homozygotní, heterozygotní) (počet polymorfních míst)	RE
17. (4927–5569)	642	<u>445</u> + 170 + (27) (homozygot) <u>334</u> + <u>111</u> + 170 + (27) (homozygot) <u>445</u> + <u>334</u> + <u>111</u> + 170 + (27) (heterozygot) (1 polymorfní místo, L - totožné s místem na amplifikátu č. 21; částečný překryv amplifikátů)	StyI
21. (4927–5618)	691	<u>445</u> + 170 + 76 (homozygot) <u>334</u> + <u>111</u> + 170 + 76 (homozygot) <u>445</u> + <u>334</u> + <u>111</u> + 170 + 76 (heterozygot) (1 polymorfní místo, L - totožné s místem na amplifikátu č. 17; částečný překryv amplifikátů)	
Poznámka: Polymorfní místa detekovaná RE <i>StyI</i> na úseku č.17 a č.21, jsou do celkového výčtu vykazována společně, jako <b><u>jediné polymorfní místo, L</u></b> . Důvodem je částečný překryv úseků.			
18. (4514–5131)	617	337 + <u>160</u> + <u>120</u> (homozygot) 337 + <u>280</u> + <u>160</u> + <u>120</u> (heterozygot) (1 polymorfní místo, N – totožné s místem na amplifikátu č.19; částečný překryv amplifikátů)	AvaI
19. (4507–5244)	737	450 + <u>160</u> + <u>127</u> (homozygot) 450 + <u>287</u> + <u>160</u> + <u>127</u> (heterozygot) (1 polymorfní místo, N – totožné s místem na amplifikátu č.18; částečný překryv amplifikátů)	
Poznámka: Polymorfní místa detekovaná RE <i>AvaI</i> na úseku č.18 a č.19, jsou do celkového výčtu vykazována společně, jako <b><u>jediné polymorfní místo, N</u></b> . Důvodem je částečný překryv úseků.			

Tab. 39: Výčet rozdílných výskytů polymorfních míst, mezi statusem TL a BL v rámci stejných typů amplifikátů a RE *AvaI*, kdy jen u ní vznikly tyto rozdíly

Číslo amplifikátu; Rozsah úseku	Délky amplifikátů PCR (bp)	<i>RE: AvaI</i>	
		Délky restričních fragmentů – bp; Restriční modely	
		Status BL	Status TL
11. (9885–10437)	552	<u>280 + 160 + 112</u> (homozygotní model)	<u>280 + 160 + 112</u> (homozygotní model) <u>552 + 280 + 160 + 112</u> (heterozygotní model) <b>(2 polymorfní místa, G, H)</b>
14. (6369–7067)	698	<u>698</u> (homozygotní model) <u>698 + 525 + (173)</u> (heterozygotní model) <b>(1 polymorfní místo, K)</b>	<u>698</u> (homozygotní model)
17. (4927–5569)	642	<u>642</u> (homozygotní model) <u>501 + 141</u> (homozygotní model) (1 polymorfní místo, M – totožné s amplifikátem č. 21; překryv amplifikátů)	<u>642</u> (homozygotní model)
21. (4927–5618)	691	<u>691</u> (homozygotní model) <u>691 + 550 + 141</u> (heterozygotní model) (1 polymorfní místo, M – totožné s amplifikátem č.17; překryv amplifikátů)	<u>691</u> (homozygotní model)
		Poznámka: Polymorfní místa detekovaná RE <i>AvaI</i> na úseku č.17 a č.21, jsou do celkového výčtu vykazována společně, jako <b><u>jediné polymorfní místo, M.</u></b> Důvodem je částečný překryv úseků.	



### 5.2.3 Výsledky detekce tiché bodové mutace c.775C>T v lokusu *CD18* skotu holštýnského plemene, zvířat se statutem TL nebo BL a u českého strakatého skotu, metodou PCR-RFLP

V panelu 58 analyzovaných zvířat holštýnského plemene, bez ohledu na pohlaví a status k BLAD, bylo genotypizováno 19 % homozygotů (*TT*), 62 % heterozygotů (*CT*) a 19 % homozygotů (*CC*) (tab. 40). Výskyt alel byl v poměru 50 % (*T*) : 50 % alel (*C*) (tab. 41).

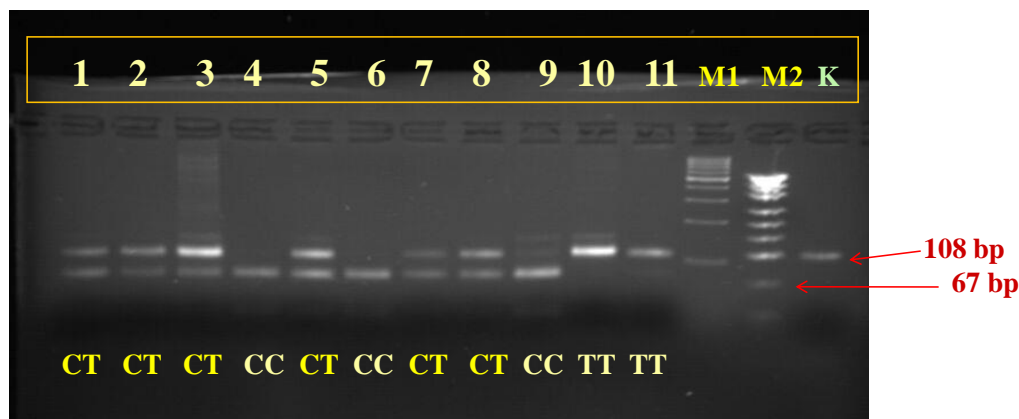
U genotypizovaných holštýnských zvířat byli nalezeni heterozygoti (*CT*) u zvířat se statutem TL i BL. Nepřítomnost homozygotů bez TM u skupiny zvířat se statutem BL lze zdůvodnit menším počtem jedinců a vzájemnou příbuzností části jedinců. Obrázek č. 8 znázorňuje část jedinců ze skupiny se statutem BL - čtyři generace příbuzných jedinců a příklad dědičnosti této tiché mutace. Příklad genotypizace vzorků je uveden na obr.č. 7.

Alela pro tichou mutaci (TM) byla detekována nejen u holštýnského plemene, ale i u českého strakatého skotu, kdy v genotypizované skupině 35 býků bylo 26 % homozygotů (genotyp *TT*) s TM, 63 % heterozygotů (genotyp *CT*) a 11 % homozygotů (genotyp *CC*) bez TM. Zároveň tak bylo zjištěno v analyzované skupině 57 % alel (*T*) pro tichou mutaci a 43 % alel (*C*) bez tiché mutace (tab. 40).

U genotypizovaných zvířat holštýnského plemene jsme pomocí Pearsonova  $\chi^2$  testu dobré shody (program Statistica verze 10) ověřili nezávislost jednotlivých genotypů (*CC*, *CT*, *TT*) na statusu TL nebo BL ( $\chi^2 = 5,3$ ; d.f. = 2;  $p = 0,068$ ).

U zkoumaných panelů holštýnského skotu a českého strakatého skotu byla zjištěna genetická rovnováha pro SNP 775C>T polymorfismus v genu *ITGB2*, ověřeno v programu Statistica (tab. 42).

Obr. 7: Genotypizace TM, gel RFLP, býci, holštýn, status TL, RE – *SatI*



Legenda: genotypizace vzorky: 1,2,3,5,7,8 – CT (108+77+31 bp); 4,6,9 – CC (77+31 bp); 10,11 – TT (108 bp); K – kontrola PCR (108 bp); velikostní markery M1 (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder), M2 (pUC19 DNA/*MspI*, marker 23)

Tab. 40: Genotypizace – tiché mutace (TM) – detekce RE - *SatI*

Plemeno a pohlaví; Status pro BLAD; Počet jedinců	Homozygoti genotyp <i>CC</i> , bez <i>TM</i> , cca 77+(31) bp (počet jedinců)	TM Heterozygoti genotyp <i>CT</i> , s <i>TM</i> cca 108+77+(31) bp (počet jedinců)	TM Homozygoti genotyp <i>TT</i> s <i>TM</i> 108 bp (počet jedinců)
H - plemeníci; (TL); 35	9	17	8
H – plemenice; (TL); 10	2	7	1
H – obě pohlaví; (BL); 14	0	12	2
Celkem H skot: 58 kusů	11 (19 %)	36 (62 %)	11 (19 %)
C – plemeníci; (TL); 35 Celkem C: 35 kusů	4 (11 %)	22 (63 %)	9 (26 %)
Celkem obou plemen: 93	15 (16 %)	58 (62 %)	20 (22 %)

Tab. 41: Genotypové a alelické frekvence (pro tichou mutaci 775C>T) v genu *ITGB2* pro holštýnské plemeno skotu a český strakatý skot

skupina zvířat – plemeno (status)	počty zvířat	genotypová frekvence			alelická frekvence	
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
holštýn (všechna BL+TL)	n = 58	0,190	0,620	0,190	0,500	0,500
holštýn (pouze TL)	n = 44	0,250	0,545	0,205	0,523	0,477
český strakatý skot	n = 35	0,114	0,629	0,256	0,429	0,571

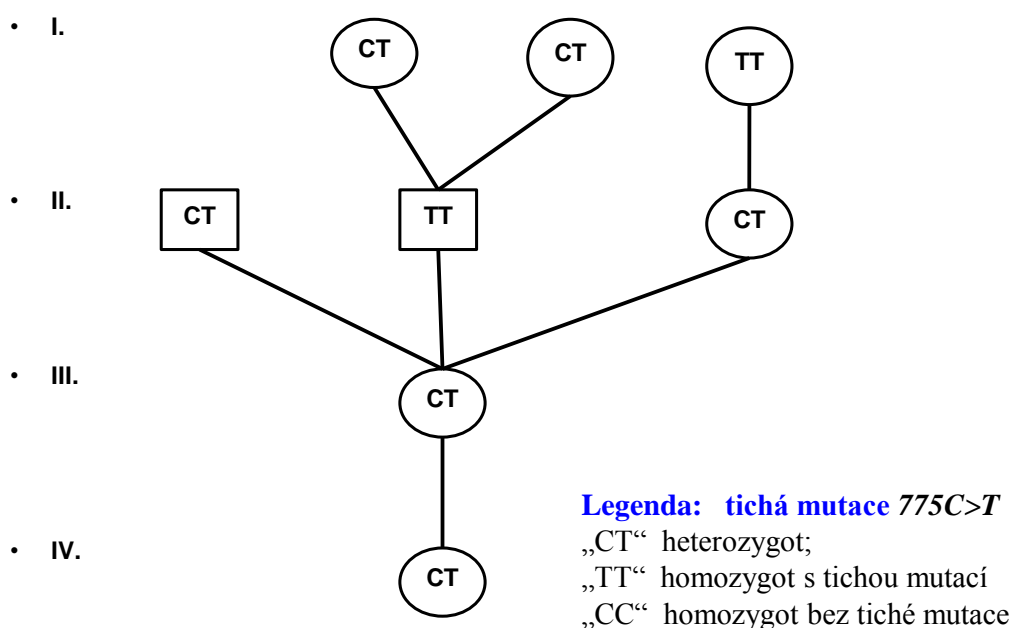
Tab. 42: Genetická rovnováha pro SNP 775C>T polymorfismus v genu *ITGB2* pro holštýnské plemeno skotu (rozdělení na BL a TL) český strakatý skot

skupina zvířat – plemeno (status)		genotypy			$\chi^2$
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
holštýn (všechna BL+TL)	observed	11	36	11	3,379
	expected	14,5	29,0	14,5	NS
holštýn (pouze jen TL)	observed	11	24	9	0,365
	expected	12,0	22,0	10,0	NS
český strakatý skot (jen TL)	observed	4	22	9	2,75
	expected	6,4	17,2	11,4	NS

NS – nonsignificant ( $p > 0,05$ )

Obr. 8: Příklad dědičnosti tiché mutace – rodokmen – příbuznost některých hodnocených zvířat

Čtyři generace zvířat se statusem BL – přehled dědičnosti tiché mutace 775C>T



### Diskuse k výsledkům

Výsledky naší analýzy lze porovnat s údaji v práci CZARNIK et al. (2007a). Polští autoři rovněž zkoumali frekvence genotypů a alel pro TM, SNP 775C>T v bovinním genu *ITGB2*, u tří populací polských plemen skotu, černobílého - kříženci s holštýnským skotem a dvou endemických plemen - polského červeného skotu a bělohřbetého skotu.

Naše výsledky zjištěné u holštýnského a českého strakatého plemene jsou v některých parametrech shodné s polskými, v některých se liší. U námi sledovaných plemen bylo zjištěno přibližně stejné zastoupení alelických frekvencí C (43 % a 50 %) a T (50 % a 57 %), zatímco u polských populací výskyt alelické frekvence C (zjištěn v rozsahu 64,9–77,1 %) jednoznačně převažoval nad T (22,9–35,1 %).

Shodu ve výsledcích jsme zaznamenali v převaze frekvence heterozygotního genotypu CT nad ostatními genotypy u holštýnských plemen – u našeho holštýnského skotu bylo zjištěno 62 % a u polského černobílého skotu 60,1 %. Naopak u polských endemických plemen byla v převaze genotypová frekvence CC (polský červený skot 55,9 %, polský bělohřbetý skot 60 %).

Rozdíl byl zjištěn porovnáním genotypové frekvence *TT*, kdy u polských plemen byla v rozmezí (5,1–8,8 %) a u obou českých plemen byla vyšší (19 % a 25 %).

Zjištěnou shodu či rozdíly ve výsledcích obou prací lze přisoudit rozdílnosti původu zkoumaných plemen, polské černobílé plemeno je zušlechťováno podílem holštýnské krve, proto výsledky tohoto plemene byly bližší našemu holštýnskému plemeni, než obě polská endemická plemena, která mají odlišný původ a vyznačují se vyšší homozygotností (CZARNIK et al., 2007a).

Další srovnání nám poskytuje jiná práce polských autorů CZARNIK et al. (2007b), ve které byly analyzovány užítkovosti skupin dcer pěti holštýnských plemeniků. Z toho čtyři býci byli heterozygoti se statusem k BLAD (BL) a genotypem *CT*. Celkem 72 dcer zdědilo status BL a 99 dcer zdědilo status TL. Z vykázaných výsledků CZARNIK et al. (2007b) lze zjistit - bez ohledu na status k BLAD: 53 % heterozygotů *CT*, 9 % homozygotů *TT* a 38 % homozygotů *CC*. Poměr výskytu alel u dcer byl 36 % (*T*) a 64 % (*C*).

Při hodnocení holštýnského plemene spočívá shoda ve zjištění převahy heterozygotů (*CT*) 62 % - náš výzkum a 53 % - CZARNIK et al. (2007b) nad homozygoty (*CC*, *TT*). U našich hodnocených zvířat jsme našli vyrovnanější poměr mezi homozygotními genotypy *TT* a *CC*.

Námi zjištěná frekvence 50 % alely *T* u holštýnského plemene ve zkoumané skupině zvířat se liší od frekvence alely *T* 36 % - vyplývající z výsledků CZARNIK et al. (2007b).

Na frekvenci genotypů v práci CZARNIK et al. (2007b) mohly mít vliv příbuzenské vztahy mezi zvířaty ve skupinách - skupiny dcer býků, na rozdíl od námi vybraných převážně nepříbuzných jedinců - s výjimkou několika jedinců se statusem BL (obr. č.3).

Výsledky ukázaly, že recesivní alela pro BLAD může být v genu *ITGB2* ve vazbě jak s alelou *T* (pro tichou mutaci 775C>T), tak s alelou *C* (bez tiché mutace). Lze tak předpokládat, že výskyt uvedené tiché mutace nesouvisí se statusem BL nebo TL. Rovněž bylo zjištěno, že alelu *T* lze nalézt nejen u holštýnského plemene, ale rovněž i u plemene českého strakatého skotu.

Možnost výskytu alely *T* u dalších plemen skotu dokládá rovněž CZARNIK et al. (2007a).

## 6. Závěr

### 6.1 Genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v České republice

Práce dokumentuje výsledky provedených molekulárně genetických genotypizací vybraných monogenních autozomálně recesivních dědičných onemocnění skotu, a to CVM, BLAD, citrulinémie, DUMPS, deficitu krevního faktoru XI, GSD II, GSD V, na přítomnost heterozygotních nositelů v populaci skotu v ČR. Prověřováni byli zejména vytipovaní jedinci z české populace holštýnského a českého strakatého skotu, v menším množství zástupci masných plemen skotu, charolais, limousin, masný simentál, blonde d'Aquitaine, belgické modrobílé, aberdeen angus a hereford a rovněž skupina německých a polských holštýnů, včetně několika jedinců slovenského strakatého skotu.

Genotypizace byly prováděny formou specifických standardizovaných molekulárně genetických testů. Nejčastějším postupem bylo použití metody PCR-RFLP, případně AS-PCR. Zjištěné výsledky byly publikovány, viz kapitola 8.2.

U genotypizace lokusů (*ITGB2*, *UMPS*, *ASS*) na BLAD, DUMPS a citrulinémii tvořilo analyzovaný panel 406 holštýnských býků, z nich bylo 224 mladých býků, kteří zahájili v roce 2003 a 2004 testační přípařování a 182 mladých býků z inseminačních stanic, kteří byli připravováni pro vstup do inseminačních programů a celkem 161 elitních plemenic holštýnského plemene, 146 býků českého strakatého skotu a 30 býků několika masných plemen: charolais 8, limousine 6, masný simentál 2, blonde d'Aquitaine 3, belgické modrobílé 9, aberdeen angus 1 a hereford 1. Jedinci těchto masných plemen zde byli zařazeni z experimentálních důvodů, kdy je dobré zkoumat i relativně málo pravděpodobné možnosti výskytu mutantní alely. Rovněž bylo prověřováno 17 býků slovenského strakatého plemene, 3 býci holštýnského plemene používaného na Slovensku a 12 holštýnských býků využívaných v Polsku. Z důvodu existence zkoumaných postižení zejména u holštýnského plemene, byl pro genotypizaci vybrán největší podíl zvířat. Býci českého strakatého skotu byli ke genotypizaci vybráni vzhledem k tomu, že i v populaci tohoto plemene je určitý podíl zušlechťujícího holštýnského plemene, tedy nelze výskyt postižení zcela vyloučit.

U vybraných zvířat nebyl zjištěn heterozygotní přenašeč recesivní alely pro BLAD, DUMPS ani citrulinémii.

Výsledek, kdy nebyl screeningem holštýnského skotu genotypizován postižený jedinec nebo heterozygotní přenašeč onemocnění DUMPS případně citrulinémie není nijak ojedinělým, neboť obecně výskyt těchto onemocnění v populaci skotu je nižší než například u BLAD a CVM. Neprokázaný výskyt těchto dědičných onemocnění u zástupců jiných plemen rovněž nebyl překvapivý, neboť ani literární prameny neodkazují na výskyt těchto onemocnění u jiných plemen skotu.

Situace, kdy nebyl u holštýnského skotu nalezen pozitivní heterozygot na onemocnění BLAD, rovněž není nijak výjimečnou, neboť úroveň výskytu BLAD v populaci holštýnského skotu klesá od počátku tohoto století na základě mezinárodně (WHFF a EHRC) přijatých a uplatňovaných opatření, včetně opatření Svazu chovatelů holštýnského skotu ČR (od r. 2004), jejichž cílem, který se daří pozvolna naplňovat, je zamezení výskytu tohoto dědičného onemocnění. Jestliže u prověřovaných mladých býků, vstupujících do testačního připárování, nebyl nalezen heterozygotní přenašeč recesivní alely, svědčí to o pozitivním dopadu opatření přijatých k tlumení výskytu BLAD v České republice.

Dovoz plemenného materiálu v 90. letech byl příčinou výrazného nárůstu populace holštýnského skotu v ČR, zároveň tím docházelo i k šíření zejména BLAD a CVM, tehdy ještě nerozpoznaných genetických postižení do našich chovů.

Genotypizací genu *SLC35A3* na heterozygoty CVM 161 elitních holštýnských plemenic vybraných v letech 2003–2007 do panelu bylo zjištěno 32 skrytých heterozygotních nositelů onemocnění (CV), zbývajících 129 plemenic byly zdravé homozygotky dominantní (TV). Frekvence heterozygotních jedinců byla 19,9 % a relativní frekvence recesivní alely v přežívající části populace bez homozygotů recesivních byla 9,9 %. Výskyt CV jedinců mezi elitními plemenicemi lze vyhodnotit jako poměrně vysoký.

Genotypizovaná zvířata nebyla vybrána náhodně, ale cíleně dle znalosti původu a s předpokladem možné vyšší pravděpodobnosti výskytu CV jedinců.

Jak již bylo uvedeno, Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o. s. vydal s platností od 1. 1. 2004 v souladu se zahraničními chovatelskými organizacemi metodický pokyn s názvem Opatření k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR. Zavedené postupy mají pomoci zjišťovat skryté přenašeče onemocnění zejména CVM i BLAD a ty co nejvíce z plemenitby eliminovat. Údaje o dědičných onemocněních jsou uváděny i v plemenářské dokumentaci.

Svaz rovněž na svých webových stránkách zpřístupnil databázi s názvem Býci se známým statusem CVM – registrovaní. Z celkového množství 2 919 zde uvedených býků

narozených v letech 1988 – 2010 je zde uvedeno 5,4 % se statusem CV, s významně klesajícím trendem až nulovým výskytem u nejmladších ročníků.

Povinné testování plemeníků a elitních plemenic na CVM prováděné v ČR stále pokračuje, přestože počty ročně vyšetřených zvířat dle informace akreditované laboratoře ČMSCH, a.s. cca od roku 2010 výrazně klesají, neboť domácí populace holštýnského skotu, zejména plemeníků, je dostatečně prověřena a pokud pocházejí z chovatelsky vyspělých zemí, bývá jejich status rovněž znám.

Důvodem testování je zejména přetrvávající výskyt recesivní alely v samičí populaci holštýnského skotu, který je vyšší než u býků, kde již byla úroveň skrytých nositelů onemocnění razantně snížena. Ústup onemocnění CVM je v populaci holštýnského skotu v ČR i ve světě ve srovnání s onemocněním BLAD pozvolnější.

Genotypizací 113 jedinců na GSD V, lokusu *PYGM*, vybraných plemen chovaných v ČR, a to českého strakatého skotu, charolais, limousine, masného simentálu, blonde d'Aquitaine, belgického modrobílého, aberdeen anguse, nebyl zjištěn výskyt nemocného jedince či heterozygotního nositele recesivní alely tohoto onemocnění. Tento výsledek nezměnil předpoklad, že onemocnění se týká zejména masného plemene charolais, případně jeho kříženců, protože nositel mutantní alely nebyl nalezen ani v populacích jiných plemen.

U stejného panelu 113 jedinců a plemen jako u GSD V byla provedena genotypizace lokusu pro GSD II, a to v exonech 7, 9, 13 genu *GAA*. Genotypizací nebyl zjištěn žádný heterozygotní ani homozygotně recesivní nositel mutace, všechna genotypizovaná zvířata byla shledána jako zdraví homozygoti dominantní.

Genotypizace exonů 12 a 9 lokusu *F11* pro deficit krevního koagulačního faktoru XI. Ze všech 309 genotypizovaných zvířat v exonu 12 bylo 249 kusů německého holštýna, 30 českého holštýna, 30 českého strakatého skotu. V exonu 9 bylo genotypizováno 152 jedinců, 60 německých holštýnů, 40 českých holštýnů, 52 jedinců českého strakatého plemene. Byl zjištěn pouze jeden případ heterozygotní nositelky této mutace vyskytující se v exonu 12. Pozitivní vzorek byl zjištěn u krávy německého holštýnského skotu z vyšetřované skupiny 189 býků a 60 krav. Výskyt jediného případu potvrzuje sporadický výskyt této mutace v populaci holštýnského skotu.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že situace výše uvedených dědičných onemocnění v české populaci holštýnského skotu není ve srovnání se zahraničím nijak odlišná, spíše se jeví optimisticky.

Z onemocnění je nutno nadále věnovat zvýšenou pozornost onemocnění CVM, které je v populaci holštýnského skotu, případně jejich kříženců, stále přítomno.



U dalších dědičných postižení buď výskyt nebyl zaznamenán, nebo jen velmi sporadicky. U ostatních prověřovaných plemen nebyl výskyt nositelů jednotlivých onemocnění zjištěn. Přestože výskyt prověřovaných onemocnění v populaci skotu v ČR není nikterak vážný, je třeba mít situaci pod dohledem a naši populaci skotu chránit zejména před zavlečením nežádoucích vloh ze zahraničí.

Bohužel zdravotní situace skotu v oblasti dědičných chorob není setrvalá, ale prochází vývojem, v průběhu let jsou zjišťována další nová dědičná onemocnění. V práci jsou uvedeny návrhy některých opatření v KDZ, která by mohla přispět k tomu, že situace v našich chovech skotu zůstane nadále pod kontrolou.

## 6.2 Molekulárně genetická analýza DNA v lokusu *ITGB2* skotu

Vyhodnocována byla DNA 17 holštýnských jedinců, část lokusu *ITGB2* o velikosti 8725 bp DNA, se vztahem k onemocnění BLAD, z toho 5 zvířat se statusem BL, heterozygoti s alelou s mutací pro BLAD a 12 se statusem TL, zdraví homozygoti bez BLAD. Locus byl metodou PCR-RFLP amplifikován v úsecích pomocí 21 párů primerů. Každý amplifikovaný fragment byl genotypizován deseti restrikcími endonukleázami II. třídy. Celkem bylo genotypizováno 3570 vzorků.

Počet SNPs detekovaný metodou PCR-RFLP ve sledovaném úseku lokusu *ITGB2* se u zvířat se statusem TL nebo BL v zásadě nelišil. S použitím deseti vybraných RE bylo zjištěno celkem 14 restrikcími polymorfních míst, a to u restriktáz *TaqI*, *AvaI*, *StyI*, *MseI*. Deset polymorfních míst mělo stejný výskyt bez ohledu na status, zbývající dvě byla nalezena pouze u jedinců statusu BL a dvě pouze u jedinců TL. Zjištěná odchylka mohla být způsobena zejména nižším počtem vyšetřených jedinců. Průměrný výskyt jednoho SNP na počet nukleotidů (délku úseku) je cca 1 : 623, koresponduje s výsledky jiných autorů.

Výsledky dosažené metodou PCR-RFLP ukázaly, že recesivní alela pro BLAD v lokusu *ITGB2* může mít společný výskyt s alelou *T* (pro tichou mutaci 775C>T), případně s alelou *C* (bez tiché mutace). Rovněž bylo zjištěno, že alelu *T* lze nalézt nejen u holštýnského plemene skotu, ale rovněž i u plemene českého strakatého skotu.

Zjištěné SNPs a tichá mutace v lokusu *ITGB2* (*CD18*) nesouvisí se statusem BL nebo TL, nemají vztah ke zdravotnímu stavu, postižení BLAD.

## 6.3 Doporučení pro praxi

Genetická onemocnění jsou zaznamenána u většiny plemen skotu, frekvence výskytu bývá převážně nízká, nevzbuzující větší obavy. Některé vady se vyskytují častěji u většího počtu plemen, jiná onemocnění se vyskytují vzácně s vazbou na určité plemeno, u jiných však došlo k tak významnému zvýšení frekvence v populaci, že vznikl nezanedbatelný ekonomický problém, který je nutno řešit přijetím opatření vedoucích k nápravě.

Zanedbané nebo neodhalené genetické onemocnění se může zprvu nepozorovaně šířit od jednoho mutanta mnoha generacemi potomků, řádově desetiletí. Není-li včas detekováno, může způsobit v závislosti na rozsahu populace, za podpory umělé inseminace, ekonomické ztráty i mezinárodního rozsahu, viz např. onemocnění holštýnského skotu BLAD a CVM. Pokud se již taková mutantní alela genu dostane do populace, dochází zejména u komerčních stád často i k celosvětovému rozšíření. Následně je finančně a zejména časově náročné tuto alelu genu z populace zcela vymýtit.

Mutace DNA jsou přirozeným procesem, nelze jim zabránit, jejich vznik a počátky šíření v populaci nejsou snadno rozpoznatelné. Proto je důležitá zejména včasná prevence vůči většímu rozšíření nových typů mutací v populacích skotu. Optimální by bylo mít takový objem finančních prostředků, který by umožnil diagnózu "každého" z veterinárního hlediska klinicky atypického případu, následné propojení do centralizované informační datábase a analýzu spočívající v porovnání s již získanými výsledky od jiných zvířat, například příbuzných jedinců, což je z genetického hlediska významné. Pokud by klinické projevy zdravotních potíží odkazovaly na genetický původ, následovala by analýza molekulárně genetických příčin, vývoj testů na screening např. heterozygotních nositelů mutace.

Pokrok v molekulárně genetické analýze může pomoci identifikovat příčinné mutace anomálií, které se fenotypově projevují při narození nebo později v životě. Mnoho z dědičných anomálií bylo charakterizováno, podobně jako u kvalitativních genetických znaků, změnami pouze na jednom místě, případně na více než dvou či třech různých lokusech. V současnosti jsou k dispozici molekulárně genetické testy pro screening řady genetických nemocí monogenních či oligogenních, zejména monogenních genetických chorob recesivně založených.

Pokud má monitoring zaměřený na dědičné poruchy zdraví plnit svůj účel, je nutné zohlednit již známé informace, že postižení často přímo souvisí s určitým plemenem, což podstatně snižuje náklady na tuto činnost. Z výzkumného hlediska však nelze vyloučit ani

doplňkové genotypizace jedinců jiných plemen, neboť mohou neočekávaně přinést nové informace.

Molekulárně genetické metody umožňují rychlou genotypizaci zejména heterozygotních, často fenotypově skrytých, přenašečů specifických monogenních defektů s recesivním založením a jejich následnou eliminaci z plemenitby. U tohoto typu genetických postižení s klasickou mendelovskou dědičností je eliminace mutantní alely z populace relativně jednoduchá. Pokud by byl proces důsledně plněn, v plemenitbě by tak po určité době zůstávali pouze zdraví homozygoti bez poškozené alely genu.

Strategie vedoucí k eliminaci zejména monogenních defektů způsobených recesivními alelami určitých genů by měla začít u elitních plemenných zvířat obou pohlaví, neboť u nich se předpokládá největší množství potomků a mohou tedy být těmi hlavními šířiteli onemocnění v populacích. Největší riziko z hlediska světové populace skotu tak představují špičkoví plemenci, kteří mají vlivem umělé inseminace řádově i statisíce potomků v chovech mnoha států. Proto je nezbytné začít s genotypizací právě u nich, optimálně na mezinárodní úrovni. Následovat by měla genotypizace ostatních jedinců zapsaných v plemenných knihách. To však v praxi nebývá důsledně prováděno. Proto praktická eliminace těchto typů onemocnění není tak rychlá a efektivní.

Optimální je situace, pokud je možnost včas detekovat předka původního nositele a šířitele sledované mutace. Přímá detekce molekulárně genetickým testem však již mnohdy nebývá možná, neboť od jedince již nemáme DNA, potom lze použít nepřímou cestu z rodokmenové analýzy. Včasná znalost primárního mutantu, případně jeho přímých heterozygotních potomků, usnadňuje proces genotypizace v populaci a pravděpodobně i snižuje její náklady, neboť lze předem vyloučit jedince na základě rodokmenové analýzy, kteří teoreticky nemohou být nositeli mutantní alely.

Pokud známe genotyp obou rodičů probanda a výsledek by byl z hlediska přítomnosti mutantní alely negativní, potom samozřejmě není nutno provádět genotypizaci jejich ostatních společných potomků.

V rámci kontroly dědičnosti zdraví (KDZ) by měla probíhat centrální veterinární evidence výskytu detekovaných případů homozygotů recesivních, abortů plodů, mrtvých narozených telat, případně telat s pozdějšími klinickými projevy dědičného postižení. Tato evidence by mohla být vodítkem pro snadnější vyhledávání heterozygotních jedinců, zde rodičů těchto jedinců.

V případě zjištění heterozygota lze doporučit tento postup genotypizace a následná opatření:

- Provéřit genotypizací oba jeho rodiče molekulárně genetickým testem, je-li to ještě prakticky uskutečnitelné, případně pokusit se provést genotypizaci nepřímo rodokmenovou analýzou předků. Tím lze zjistit, ze které strany předků byla mutace potomkům předána.
- Následně by mělo být prověřeno veškeré, v plemenitbě využívané, nejbližší potomstvo (synové a dcery) tohoto skrytého nositele mutace, včetně jeho vlastních i nevlastních sourozenců pocházejících z heterozygotního rodiče.
- Potenciální mladí plemeníci, plemenic, genotypizovaní jako heterozygoti by neměli být do plemenitby vůbec zařazováni.
- Genotypizací zjištění heterozygoti obou pohlaví již zapojení v plemenitbě by měli být neprodleně z plemenitby vyřazeni bez ohledu k jejich plemenné hodnotě, například u plemeníků zákazem používání jejich inseminačních dávek, případně využívání v přirozené plemenitbě, u plemenic zastavení embryotransferů, využívání jejich pohlavních buněk či embryí. Jednoznačné vyloučení nositele mutace z procesu plemenitby zcela eliminuje riziko náhodného šíření.

V ČR i v zahraničí jsou však v praxi uplatňována opatření, doporučující u plemenářsky hodnotných zvířat (zejména býků) genotypizovaných jako heterozygoti jejich ponechání po určitou dobu v plemenitbě s tím, že jsou v plemenné knize jako heterozygotní nositelé dědičného onemocnění evidováni a v přípařovacím plánu připouštění pouze na zdravé homozygoty dominantní. Viz například „Opatření svazu chovatelů holštýnského skotu ČR k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR“ (2004) (příloha 2).

Jejich potomstvo by mělo být následně prověřeno genotypizací s vyřazením heterozygotních nositelů mutace. Potomci, kteří nebudou určeni pro reprodukci, mohou být ponecháni.

Riziko těchto postupů spočívá v tom, že jakákoliv nedůslednost nebo opomenutí v provádění těchto postupů má za následek zpomalování procesu eliminace konkrétních mutantních alel v populaci s dopadem na ekonomiku chovu.

U dovezených jedinců (případně jejich ID, embryí) ze zahraničí, před zařazením do plemenitby, by mělo být zvíře již genotypizováno na sledovaná dědičná onemocnění.

Nejen u již známých dědičných onemocnění, kdy je již genotypizace zavedena, ale zejména u nových onemocnění, kdy genotypizací teprve zjišťujeme stav promoření populace mutovanou alelou genu, včetně jejich individuálních nositelů, je bezpodmínečně nutné tuto informaci

neprodleně předávat organizaci spravující příslušnou plemennou knihu. Následně by měl být proveden záznam o výsledku provedené genotypizace v plemenné knize a u zjištěných nositelů mutace jejich vyřazení z plemenitby.

Praxe označovat v plemenných knihách výsledky genotypizací, včetně nositelů mutovaných genů je u některých genetických onemocnění a plemen již zavedena, viz „Opatření svazu chovatelů holštýnského skotu ČR k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR“. Tento postup zvyšuje informovanost chovatelské veřejnosti o zdravotním stavu populace skotu, zejména plemenářsky využívaných jedinců, tím je předcházeno riziku šíření dědičných onemocnění v populacích jednotlivých plemen.

Systém kontroly dědičnosti zdraví je složitý proces s mnoha účastníky, kdy majitelé zvířat, ID, embryí, by měli mít hlavní díl zodpovědnosti, neboť bez jejich spolupráce by byl tento systém kontroly zcela nefunkční.

Zejména dobře připraveným a důsledně uplatňovaným systémem kontroly dědičnosti zdraví prováděné chovatelskými svazy ve spolupráci s veterinární službou i s přiměřenou finanční podporou státních institucí, kontrolou užitkovosti a zodpovědnou plemenářskou prací chovatelů, ale i výzkumem v oblasti genetiky skotu a veterinární medicíny, případně spoluprací s humánními obory medicíny, lze včas odhalit vznik s počínajícím šířením těchto nových dědičných onemocnění v populacích skotu s následným zavedením účinných opatření k jejich eliminaci.

K zamezení šíření nových i stávajících genetických onemocnění skotu ve světě je nutná mezinárodní spolupráce všech zainteresovaných složek a zejména zpřísnění, sjednocení a důsledné dodržování dohodnutých postupů.

Zvláštní význam má rozšíření genotypizace plemenných býků na čipech pro účely genomové selekce. Lze doporučit, aby na čipu byly rovněž SNP v genech, které způsobují závažné geneticky podmíněné patologické stavy. Tento trend je v poslední době podpořen tím, že významné firmy vyrábějící čipy nabízí tzv. customer čipy umožňující testaci dědičných chorob.

## 7. Souhrn

Dovoz plemenného materiálu za účelem zvýšení úrovně užitkovosti skotu způsobil nejen nárůst populace, zejména holštýnského skotu a dalších plemen v ČR, ale rovněž přispěl na počátku 90. let i k šíření tehdy ještě nerozpoznaných genetických onemocnění ze zahraničí do našich chovů. Toto bylo potvrzováno následnými screeny zejména u postižení BLAD a CVM.

Autozomálně recesivní monogenní onemocnění BLAD – deficit adheze leukocytů skotu a CVM – komplex vertebrálních malformací jsou v populaci holštýnského skotu celosvětově rozšířena. Onemocnění způsobují úhyny telat u BLAD a u CVM aborty plodů. Skryté šíření těchto onemocnění ve světové populaci holštýnského skotu trvalo více než 30 let, až dosáhlo ekonomicky znepokojivé úrovně, kdy například výskyt plemeníků – heterozygotních nositelů alely postižení – převyšoval dle odhadu v některých zemích i 10 %. S rozvojem molekulární genetiky byla v minulých desetiletích tato letální genetická onemocnění klinicky rozpoznána a byla identifikována jejich genetická podstata, včetně způsobu detekce klinicky zdravých heterozygotních nositelů.

Genetická onemocnění, jejichž rozšíření v populaci již není zanedbatelné, mívají pro chovatele nepříznivý ekonomický dopad. Vzhledem ke světovému významu holštýnského plemene je proto snahou chovatelských organizací mezinárodním sjednocením postupů, globálně eliminovat onemocnění BLAD a CVM z populace skotu. Rovněž chovatelé v ČR mají k této problematice zodpovědný přístup a i zde byla přijata selektivní opatření k nápravě situace. I tato práce měla přispět ke zdárnému řešení.

### Cíle práce

Cílem předkládané práce byla molekulárně genetická analýza vybraných recesivních dědičných poruch zdraví u plemen skotu chovaných v ČR, jejichž existence je převážně zapříčiněna některým z typů genových bodových mutací.

Na souborech jedinců několika plemen byly provedeny genotypizace vybraných monogenních autozomálně recesivních dědičných onemocnění skotu, a to CVM, BLAD, citrulinémie, DUMPS, deficitu krevního faktoru XI, GSD II, GSD V, na přítomnost heterozygotních nositelů v populaci skotu v ČR.

Dále byla provedena molekulárně genetická analýza lokusu *CD18 (ITGB2)*. Metodou polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) byla u holštýnských krav se statutem TL (homozygoti bez varianty genu pro BLAD) a BL (heterozygoti) vyhledávána vybranými

restrikčními endonukleázami třídy II polymorfni místa. Výskyt polymorfismů byl vyhodnocen ve vztahu ke statusu TL a BL.

Dalším cílem byla analýza tiché mutace c.775C>T bez fenotypové manifestace v lokusu *CD18* skotu holštýnského plemene, u zvířat se statutem TL nebo BL a u českého strakatého skotu, provedená metodou PCR-RFLP.

## Metodika

Pro genotypizaci na vybraná onemocnění CVM, BLAD, citrulinémie, DUMPS, deficitu krevního faktoru XI, GSD II, GSD V, byl vždy vytvořen panel zvířat složený z jedinců a plemen se vztahem k výskytu onemocnění v populaci skotu.

Genotypizována byla DNA izolovaná z krve, případně spermatu plemenných zvířat. Genotypizace zvířat byly prováděny formou specifických standardizovaných molekulárně genetických testů. Nejčastějším postupem bylo použití metody PCR-RFLP, případně AS-PCR, s využitím ELFO na agarózovém gelu.

Pro genotypizaci lokusu genu *SLC35A3* na CVM heterozygoty metodou AS-PCR bylo v letech 2003–2007 cíleně vybráno 161 elitních holštýnských plemenic, dle původu a s předpokladem vyšší pravděpodobnosti výskytu CV jedinců.

U genotypizace lokusů DNA (*ITGB2*, *UMPS*, *ASS*) metodami PCR-RFLP na přítomnost alel pro BLAD, DUMPS a citrulinémii, tvořilo analyzovaný panel 406 holštýnských býků, z nich bylo 224 mladých býků, kteří zahájili v roce 2003 a 2004 testační přípařování a 182 mladých býků z inseminačních stanic, kteří byli připravováni pro vstup do inseminačních programů. Dále bylo vyšetřeno celkem 161 elitních plemenic holštýnského plemene, 146 býků českého strakatého skotu a 30 býků několika masných plemen: charolais 8, limousine 6, masný simentál 2, blonde d'Aquitaine 3, belgické modrobílé 9, aberdeen angus 1 a hereford 1. Jedinci těchto masných plemen zde byli zařazeni z experimentálních důvodů, kdy je dobré zkoumat i relativně málo pravděpodobné možnosti výskytu mutantní alely. Rovněž bylo prověřováno 17 býků slovenského strakatého plemene, 3 býci holštýnského plemene ze Slovenska a 12 holštýnských býků využívaných v Polsku. Z důvodu existence zkoumaných postižení zejména u holštýnského plemene, byl pro genotypizaci vybrán největší podíl zvířat. Býci českého strakatého skotu, případně slovenského strakatého skotu, byli ke genotypizaci vybráni vzhledem k tomu, že i v populaci tohoto plemene je určitý podíl zušlechťujícího holštýnského plemene, tedy nelze výskyt postižení zcela vyloučit.

Metodou PCR-RFLP byl genotypizován lokus *PYGM* na přítomnost alely pro GSD V u 113 jedinců vybraných plemen chovaných v ČR, z tohoto počtu bylo 62 býků českého

strakatého skotu kombinovaného užitkového typu, 34 plemeníků charolais, 4 limousine, 2 býci masného simentálu, 4 blonde d'Aquitaine, 6 býků plemene belgické modrobílé, 1 aberdeen angus.

U stejného panelu 113 jedinců a plemen jako u GSD V byla metodami PCR-RFLP provedena genotypizace lokusu pro GSD II, a to v exonech 7, 9 a 13 genu *GAA*.

Metodou PCR byla provedena genotypizace exonů 12 a 9 lokusu *F11* pro deficit krevního koagulačního faktoru XI. Panel 309 genotypizovaných zvířat pro analýzu mutace v exonu 12 tvořilo 30 plemeníků holštýnského plemene a 30 plemeníků českého strakatého skotu, vstupujících do testačního připravení v letech 2003–2005. Současně bylo testováno 189 býků a 60 krav německého holštýnského plemene. Genotypizace mutace v exonu 9 proběhla na panelu 40 českých plemeníků holštýnského plemene a 52 plemeníků českého strakatého skotu, vstupujících do programu inseminace v letech 2003–2005. Současně bylo testováno 60 býků německého holštýnského plemene.

K analýze výskytu polymorfismů v části lokusu *CD18 (ITGB2)* byly použity vzorky DNA 17 holštýnských jedinců genotypizovaných na onemocnění BLAD, z toho 5 zvířat se statusem BL (heterozygoti) a 12 se statusem TL (zdraví homozygoti). Locus byl metodou PCR-RFLP amplifikován v úsecích pomocí 21 párů primerů. Každý amplifikovaný fragment byl postupně genotypizován deseti restrikcími endonukleázami II. třídy. Celkem bylo pro 17 jedinců genotypizováno 3570 vzorků.

Panel zvířat k provedení analýzy tiché mutace c.775C>T v lokusu *CD 18* byl sestaven ze zvířat dvou plemen. Holštýnské plemeno zastupovalo 34 náhodně vybraných býků z 5 linií, narozených v letech 1998–2003 a 10 krav s ověřeným statusem TL. Dále bylo analyzováno 14 holštýnských zvířat s ověřeným statusem BL, narozených v období 1994–2006, z toho 9 krav s jalovicemi a 5 mladých býčků, tato zvířata byla součástí tří příbuzenských skupin. Druhou plemennou skupinou bylo 35 náhodně vybraných býků českého strakatého skotu z 9 linií, narozených v letech 2000–2003, se statusem TL.

### **Zjištěné výsledky**

Genotypizací na CVM bylo zjištěno 32 skrytých heterozygotních nositelek onemocnění (CV), zbývajících 129 plemenic byly zdravé homozygotky dominantní (TV). Frekvence heterozygotních jedinců byla 19,9 % a relativní frekvence recesivní alely v přežívající části populace bez homozygotů recesivních byla 9,9 %. Výskyt CV jedinců mezi elitními plemenicemi lze vyhodnotit jako poměrně vysoký.



Genotypizací vybraných zvířat nebyli zjištěni heterozygotní přenašeči recesivních alel pro BLAD, DUMPS ani citrulinémií, všechna zvířata byla shledána jako zdraví homozygoti dominantní.

Genotypizací pro postižení GSD V a GSD II rovněž nebyl zjištěn žádný heterozygotní ani homozygotně recesivní nositel mutace, všechna genotypizovaná zvířata byla shledána jako zdraví homozygoti dominantní.

Pro deficit krevního koagulačního faktoru XI byl zjištěn pouze jeden případ heterozygotní nositelky této mutace, vyskytující se v exonu 12, u krávy německého holštýnského skotu z vyšetřované skupiny 249 jedinců.

Počet SNPs detekovaný metodou PCR-RFLP ve sledovaném úseku lokusu *ITGB2* se u zvířat se statutem TL nebo BL v zásadě nelišil. S použitím deseti vybraných RE bylo zjištěno celkem 14 restričních polymorfních míst, a to pro restriktázy *TaqI*, *AvaI*, *StyI*, *MseI*. Deset polymorfních míst mělo stejný výskyt bez ohledu na status, zbývající dvě byla nalezena pouze u jedinců statusu BL a dvě pouze u jedinců statusu TL. Průměrný výskyt SNPs na počet nukleotidů (délku úseku) cca 1 : 623 koresponduje s výsledky jiných autorů.

Provedením analýzy výskytu tiché mutace bylo zjištěno, že recesivní alela pro BLAD v lokusu *ITGB2* může mít společný výskyt s alelou *T* (pro tichou mutaci  $775C>T$ ), případně s alelou *C* (bez tiché mutace). Rovněž bylo zjištěno, že alelu *T* lze nalézt nejen u holštýnského plemene skotu, ale rovněž i u plemene českého strakatého skotu.

Zjištěné SNPs a tichá mutace v lokusu *ITGB2* (*CD18*) nesouvisí se statutem BL nebo TL, nemají vztah ke zdravotnímu stavu, postižení BLAD.

## **Shrnutí**

Na základě provedených genotypizací a literárních zdrojů lze konstatovat, že výskyt genetického onemocnění BLAD je stabilizován, počty zjištěných případů jsou již velmi nízké. Přesto je nadále nezbytné v přijatých ozdravných opatřeních selektivního charakteru pokračovat. U ostatních hodnocených onemocnění (citrulinémie, DUMPS, deficit krevního faktoru XI, GSD II, GSD V) je situace rovněž stabilizována, genotypizaci v populaci skotu v ČR není nutné provádět. Je ale nezbytné sledovat situaci v zahraničí, dle potřeby provádět screening, aby se předešlo případnému zhoršení situace.

Mezinárodně přijatá opatření chovatelů holštýnského skotu k omezení šíření CVM rovněž přináší své výsledky, ale ve srovnání s BLAD je ústup onemocnění mnohem pozvolnější. Dle výsledků genotypizací je neuspokojivý procentuálně vyšší výskyt CV jedinců v populaci holštýnských plemenic proti plemeníkům, protože je tato populace početnější a není

tak dobře prověřena. Řešení je ekonomicky nákladné. Proto lze doporučit pokračovat v přijatých opatřeních, s výraznějším zaměřením na elitní plemence. Genotypizace býků musí být prováděna důsledně, používání heterozygotních plemenků musí být systematicky omezováno. Jedině tak lze dosáhnout snížení frekvence recesivní alely v populaci.

V práci jsou uvedeny návrhy některých opatření, které by v budoucnu mohly přispět k včasnému zamezení šíření recesivně podmíněných dědičných poruch zdraví.

## **7.1 Summary**

The import of the pedigree material to increase yield level of the cattle resulted not only in increase in the population, particularly of Holstein Friesian cattle and other breeds in the Czech Republic, but contributed to wide spreading of then unrecognized genetic diseases to our breeding from abroad early in the 1990s. This was then confirmed by subsequent screenings particularly for BLAD and CVM diseases.

Autosomal recessive monogenic disease BLAD - Bovine leukocyte adhesion deficiency, and CVM - complex of vertebral malformation are widely spread in the populating of the Holstein Friesian cattle. BLAD and CVM diseases cause deaths of calves and foetus abortions, respectively. Concealed spreading of the diseases across the world population of the Holstein Friesian cattle had been taking place for more than 30 years before it reached financially disturbing level when estimated prevalence in some countries exceeded 10% for breeding males - heterozygous carriers of disease allele. In the past decades, the lethal genetic diseases were clinically recognized with development of the molecular genetics, and their genetic essence was identified including detection of clinically healthy heterozygous carriers.

The genetic diseases prevalence of which in the population is not negligible have negative economic impacts on the breeders. Considering global importance of the Holstein Friesian breed, the breeding organizations striving for international unification of the procedures, global elimination of the BLAD and CVM diseases from the cattle population. The breeders in the Czech Republic act responsibly with respect to the issue and selective remedial measures were adopted here as well. The mission of this paper is contribution to successful solution.

### **Aims of the work**

The present paper focuses on molecular genetic analysis of selected recessive hereditary

health disorders of the cattle breeds farmed in the Czech Republic existence of which is particularly caused by some of types of the gene point mutations.

The groups of animals from several breeds underwent genotyping for selected monogenic autosomal recessive hereditary diseases in cattle, particularly CVM, BLAD, citrullinaemia, DUMPS, blood factor IX deficiency, GSD II, GSD V for presence of heterozygous carriers in the cattle population in the Czech Republic.

In addition, molecular genetic analysis of *CD18* locus was performed (*ITGB2*). Polymorphous loci were looked for by selective restriction class II endonucleases using the restriction fragments length polymorphism (RFLP) method in Holstein Friesian cows with TL status (homozygotes without gene variant for BLAD) and BL (heterozygotes). Polymorphism prevalence was evaluated with respect to TL and BL status.

The next goal was silent mutation analysis c.775C>T without phenotype manifestation in *CD18* locus of Holstein Friesian cattle breed, in TL or BL status animals, and in Czech Pied cattle using the PCR-RFLP method.

## **Methodology**

For the genotyping of the selected CVM, BLAD, citrullinaemia, DUMPS, blood factor IX deficiency, GSD II, GSD V diseases, a panel of animals was compiled consisting of animals and breeds related with disease in the cattle population.

DNA isolated from blood or sperms of the pedigree animals was genotyped. The genotyping of animals were carried out using specific standardized molecular genetic assays. The prevailing procedure was application of the PCR-RFLP method or AS-PCR method with ELFO on agarose gel.

For genotyping of the *SLC35A3* gene locus in CVM heterozygotes using the AS-PCR method, 161 elite Holstein Friesian breeding cows were purposefully selected between 2003–2007 by their origin and assumption of higher likelihood of CV of the animals.

For genotyping of the DNA loci (*ITGB2*, *UMPS*, *ASS*) by the PCR-RFLP methods for presence of alleles for BLAD, DUMPS, and citrullinaemia, the analyzed panel consisted of 406 Holstein Friesian bulls, of which 224 were bull calves who started test mating in 2003 and 2004, and 182 bull calves with insemination stations prepared for entry to the insemination programs. In addition, examined were 161 elite breeding cows of the Holstein Friesian breed, 146 bulls of Czech Pied cattle, and 30 bulls of a couple of meat breeds: charolais 8, limousine 6, meat Simmental 2, blonde d'Aquitaine 3, Belgian Blue 9, aberdeen angus 1, and hereford 1. The animals of the meat breeds were included here for experimental reasons where it is

appropriate to examine even relatively unlikely possibilities of mutant allele prevalence. Also, 17 bulls of Slovak Pied cattle, 3 bulls of Holstein Friesian cattle from Slovakia, and 12 Holstein Friesian bulls used in Poland were examined as well. For genotyping, the Holstein Friesian cattle had the highest portion of animals for the highest prevalence of the investigated disorder in this breed. The bulls of cattle or Slovak Pied cattle were selected for the genotyping because this population of the breed also shows some share of cultivated Holstein Friesian breed and therefore, the disorder prevalence may not be completely ruled out.

The PCR-RFLP method was applied to genotype the *PYGM* locus for presence of allele for GSD V in 113 animals of the selected breeds farmed in the Czech Republic, of which 62 bulls of Czech Pied cattle of combined useful type, 34 Charolais breeding males, 4 Limousine, 2 Beef Simmental, 4 Blonde d'Aquitaine, 6 Belgian Blue, and 1 Aberdeen Angus.

The same panel of 113 animals and breeds as for GSD V was used to genotype with the PCR-RFLP methods the locus for GSD II, specifically in exons 7, 9, and 13 of the *GAA* gene.

The PCR method was applied to genotype the exons 12 and 9 of the *FII* locus for the blood coagulation factor XI deficiency. The panel of 309 genotyped animals for mutation analysis in exon 12 consisted of 30 breeding males of Holstein Friesian breed and 30 breeding males of Czech Pied cattle entering the testing mating in 2003–2005. At the same time, 189 bulls and 60 cows of German Holstein Friesian cattle were tested. Mutation genotyping in exon 9 was performed in the panel of 40 Czech breeding males of Holstein Friesian breed, and 52 breeding males of Czech Pied cattle entering the insemination programme in 2003–2005. At the same time, 60 bulls of German Holstein Friesian cattle were tested.

The DNA samples from 17 Holstein Friesian animals genotyped for BLAD disease, of which 5 animals with BL status (heterozygotes) and 12 animals with TL status (healthy homozygotes) were used to analyze the prevalence of polymorphisms in a part of the *CD18* locus (*ITGB2*). The PCR-RFLP method was employed to amplify the locus in sections using 21 pairs of primers. Each amplified fragment was successively genotyped by ten restriction class II endonucleases. In total, 3,570 samples were genotyped for 17 animals.

The panel of animals for the silent mutation analysis *c.775C>T* in the *CD 18* locus was composed of animals from two breeds. The Holstein Friesian breed was represented by 34 randomly selected bulls of 5 lines born between 1998–2003, and 10 cows with verified TL status. In addition, 14 Holstein Friesian animals with verified BL status were analyzed, born between 1994–2006, of which 9 cows with heifers and 5 bull calves; these animals were

members of three family groups. The second pedigree group consisted of 35 randomly selected bulls of Czech Pied cattle from 9 lines born from 2000 to 2003 with TL status.

## Results

The CVM genotyping revealed 32 concealed heterozygous female disease carriers (CV); the remaining 129 breeding cows were healthy dominant homozygotes (TV). The frequency of heterozygote animals was 19.9% and the relative frequency of the recessive allele in the surviving part of the population without the recessive homozygotes was 9.9%. The presence of the CV animals among elite breeding cows can be evaluated as rather high.

The genotyping of the selected animals found no heterozygous carriers of the recessive alleles for BLAD, DUMPS, neither citrullinaemia; all animals were found as healthy dominant homozygotes.

Also, the genotyping for GSD V and GSD II disorder revealed neither heterozygote nor homozygote recessive mutation carrier; all genotyped animals were found as healthy dominant homozygotes.

As far as the blood coagulation IX factor deficiency is concerned, only one case of heterozygote female carrier of this mutation was found in exon 12 in a cow from German Holstein Friesian cattle of the investigated group of 249 animals.

Number of SNPs detected using the PCR-RFLP method in the monitored section of the *ITGB2* locus was almost the same for the animals with TL or BL status. In total 14 restriction polymorphous loci were found with the use of ten selected RE for the following restrictases: *TaqI*, *AvaI*, *SlyI*, *MseI*. Ten polymorphous loci had identical prevalence regardless status; two remaining loci were found only in the BL status animals, and two only in TL status animals. Average SNPs prevalence per number of nucleotides (section length) about 1:623 corresponds with results of other authors.

The analysis of the silent mutation prevalence found that the recessive allele for BLAD in the *ITGB2* loci may share the prevalence with *T* allele (for silent mutation 775C>T), or with *C* allele (without silent mutation). It was also found that the *T* allele might be found not only in Holstein Friesian cattle breed but also in the Czech Pied cattle breed.

The SNPs found and silent mutation in the *ITGB2* (*CD18*) locus have nothing to do with the BL or TL status, have no relation to health conditions, BLAD disease.

## Summary

It could be concluded based on the genotyping performed and bibliography that prevalence of the BLAD genetic disease is stabilized; the numbers of observed cases are not

high any more. Despite that it is further necessary to continue in the adopted remedial measures of the selective character. For other diseases in question (citrullinaemia, DUMPS, blood factor XI deficiency, GSD II, GSD V) the situation is stabilized as well, and no genotyping in the cattle population in the Czech Republic is needed. However, situation abroad needs to be monitored, and screening needs to be performed to avoid potential deterioration of the situation.

Internationally adopted measures of the Holstein Friesian cattle to restrict the CVM spreading have positive effects as well but compared to BLAD the disease decline is much slower here. The results of the genotyping indicate an unsatisfactory proportionally higher prevalence of the CV animals in the population of Holstein Friesian breeding cows compared to the breeding males because the population of the former is numerous, and not examined well. The solution is financially expensive. Therefore, continued application of the adopted measures with stronger impact on the elite breeding cows could be recommended. The genotyping of the bulls must be made properly, and use of the heterozygous breeding males must be systematically limited. This is the only way for reducing the recessive allele prevalence in the population.

The paper indicates proposals for some measures that could contribute to timely avoidance of spreading of recessive-conditioned hereditary health disorders in the future.

Key words:

Cattle, Autosomal recessive monogenic disease, BLAD, CVM, DUMPS, citrullinaemia, FXI, GSD II, GSD V, Czech Holstein cattle, gene *ITGB2*- SNPS, Silent mutation,

## 8. Přehled literatury

### 8.1 Přehled použité literatury

ACKERMANN M. R., KEHRLI M. E., LAUFER J. A., NUSZ L. T. (1996): Alimentary and Respiratory Tract Lesions in Eight Medically Fragile Holstein Cattle with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). *Veterinary Pathology*, 33, 273–281.

ADAMOVIČ H. (2004): Výsledky chovu holštýnského skotu. [online]: Agroweb – internetový zemědělský portál, Náš chov [publikováno 9.1.2004]. Dostupný na: < <http://naschov.cz/vysledky-chovu-holstynskeho-skotu/>>.

AGERHOLM J. S., BENDIXEN C., ANDERSEN O., ARNBJERG J. (2001): Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, 283–289. Doi: 10.1177/104063870101300401

AGERHOLM J. S., CHRISTIAN BENDIXEN CH., ARNBJERG J., ANDERSEN O. (2004): Morphological variation of “complex vertebral malformation” in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 548–553.

AILHAUD G., GRIMALDI P., NEGREL R. (1992): Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual Review of Nutrition*, 12, 207–233.

AKYÜZ B., BAYRAM D., ERTUGRUL O., IŞCAN K. M. (2008): Detection of Myophosphorylase Deficiency (Glycogen Storage Disease Type V) with PCR-RFLP in Charolais Cattle in Kayseri Region and in Turkey Native Cattle Breeds. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg*, 5(1), 21–25.

ANDERSON D. C., SPRINGER T. A. (1987): Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150, 95 glycoproteins. *Annual Review of Medicine*, 38, 175–194.

ANDREU A. L., NOGALES-GADEA G., CASSANDRINI D., ARENAS J., BRUNO C. (2007): McArdle disease: molecular genetic update. *Acta Myologica*, 26, 53–57.

ANGELOS S., VALBERG S. J., SMITH B. P., MCQUARRIE P. S., SHANKE S., TSUJINO S., DI MAURO S., CARDINET G. H. (1995): Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related Charolais cattle. *Muscle & Nerve*, 18, 736–740.

- ASAKAI R., DAVIE E. W., CHUNG D. W. (1987): Organization of gene for human factor XI. *Biochemistry*, 26, 7221–7228.
- ASHWELL M. S., REXROAD JR. C. E., MILLER R. H. AND VANRADEN P. M. (1996): Mapping economic trait loci for somatic-cell score in holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. *Animal genetics*, 27 (4), 235–242.
- AVBELJ M., TAHIROVIC H., DEBELJAK M., KUSEKOVA M., TOROMANOVIC A., KRZISSNIK AND BATTELINO T. (2007): High prevalence of thyroid peroxidase gene mutation in patients with thyroid dysharmonogenesis. *European Journal of Endocrinology*, 156, 511–419.
- AYERS J. R., LEIPOLD H. W. AND PADGETT G. A. (1988): Lesions in Brangus cattle with Chediak–Higashi syndrome. *Veterinary Pathology*, 25, 432–436.
- BAETHMAN M., STRAU V., REUSER A. J. J. (2008): Pompe disease. Bremen: University-Medical Verlag AG, 1–104.
- BAGLIA F. A., WALSH P. N. (1996): A binding site for thrombin in the apple 1 domain of factor XI. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 3652–3658.
- BAGLIA F. A., JAMESON B. A., WALSH P. N. (1993): Identification and characterization of a binding site for factor XIIa in the Apple 4 domain of coagulation factor XI. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 3838–3844.
- BAGLIA F. A., JAMESON B. A., WALSH P. N. (1990): Localization of the high molecular weight kininogen binding site in the heavy chain of human factor XI to amino acids phenyl alanine 56 through serine 86. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 4149–4154.
- BAIRD J. D., WOJCINSKI Z. W., WISE A. P. AND GODKIN M. A. (1987): Maple syrup urine in five Hereford calves in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, 28, 505–511.
- BANGHOVA K., AL TAJI E., NOVOTNÁ D., ZAPLETALOVÁ J., HNÍKOVÁ O., ČÁP J., KLABOCHOVÁ J., KÚSEKOVÁ M., LEBL J. (2008): Pendredův syndrom u pacientů s hypotyreózou: genetická diagnostika, fenotypová variabilita a výskyt fenokopii. *Časopis Lékařů českých*, 147, 616–622.
- BENDIXEN C., SVENDSEN S., JENSEN H., PANITZ F., AASBERG A., HOLM L.E. ET AL. (2002) assignee: Genetic test for the identification of carriers of complex vertebral malformations in cattle. Inventors; Ministeriet for Fodervarer, og Fiskeri Danmarks Jordbrugsforskning of Landburg, International patent WO0240709.



- BENDIXEN C. (2001): The CVM-mutation is not restricted to descendants of the American Holstein Friesian bull - Carlin-M Ivanhoe Bell. Danish Institute of Agricultural Sciences. [online]: CVM: Danish Institute of Agricultural Sciences. [cit. 25.5. 2009]. Dostupný na: < [http://www.adhis.com.au/v2/sitev2.nsf/\(DisplayFAQ\)?open&area=New&cat=&print=1](http://www.adhis.com.au/v2/sitev2.nsf/(DisplayFAQ)?open&area=New&cat=&print=1) >.
- BERG T., HEALY P.J., TOLLERSRUD O.K., NILSSEN Ø. (1997): Molecular heterogeneity for bovine alpha-mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. *Research in Veterinary Science*, 63 (3), 279–282.
- BERGLUND B., PERSSON A., STÅLHAMMAR H. (2004): Effects of Complex Vertebral Malformation on Fertility in Swedish Holstein Cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45, 161–165. Doi:10.1186/1751-0147-45-161
- BERRIDGE M. J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361, 315–325.
- BILSTROM J. A., VALBERG S. J., BERNOCO D. AND MICKELSON J. R. (1998): Genetic test for myophosphorylase deficiency in Charolais cattle. *American journal of veterinary research*, 59, 267–270.
- BLAU N., BONAFÉ L., BLASKOVICS M. E. (2003): Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M. E., Gibson K. M., (eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2003, 89–106.
- BLOOMER J. R., HILL H. D., MORTON K. O., ANDERSON-BURNHAN L. A., STRAKA J. G. (1987): The enzyme defect in bovine protoporphyria. Studies with purified ferrochelatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 667–671.
- BLOOMER J. R., MORTON K. O., REUTER R. J. AND RUTH G. R. (1982): Bovine protoporphyria: documentation of autosomal recessive inheritance and comparison with the human disease through measurement of heme synthase activity. *The American Journal of Human Genetics*, 34, 322–330.
- BLOOMER J. R., PHILLIPS M. J., DAVIDSON D. L., KLATSKIN G. (1975): Hepatic disease in erythropoietic protoporphyria. *American Journal of Medicine*, 58, 869–882.
- BLOWEY W. R., WEAVER A. D. (2003): *Color Atlas of Disease and Disorders of Cattle*. 2nd edition, Edinburgh: Mosby-Elsevier Science Limited, page 223. ISBN 0-7234-3205-8.

- BONKOWSKY H. L., BLOOMER J. R., EBERT P. S., MAHONEY M. J.(1975): Heme synthetase deficiency in human protoporphyria. Demonstration of the defect in liver and cultured skin fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 56, 1139–1148.
- BOSSE K., BETZ R. C., LEE Y., WIENKER T. F., REIS A., KLEEN H., PROPPING P., CICHON S. AND NÖTHEN M. (2000): Localization of a Gene for Syndactyly Type 1 to Chromosome 2q34-q36. *The American Journal of Human Genetics*, 67, 492–497.
- BOUMA B. N, GRIFFIN J. H., (1977): Human blood coagulation factor XI. Purification, properties and mechanism of activation by activated factor XII. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 6432–6437.
- BORLAND N. A., JERRET I. V. AND EMBURY D. H. (1984): Mannosidosis in aborted and stillborn Galloway calves. *The Veterinary Record*, 114, 403–405.
- BOYER P. J., JONES M. Z., NACHREINER R. F., REFSAL K. R., COMMON R. S., KELLEY J. AND LOVELL K. L. (1990): Caprine beta-mannosidosis. Abnormal thyroid structure and function in a lysosomal storage disease. *Laboratory Investigation*, 63, 100–106.
- BREM G., WANKE R., HONDELE J. AND DAHME E. (1984): Zum Auftretendes Arachnomelie-Syndroms in der Brown-Swiss x Braunvieh Population Bayerns. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 97, 393–397.
- BRENNER D.A., BLOOMER J.R.(1979): Comparison of human and bovine protoporphyria. *The Yale journal of biology and medicine*, 52, 449–454.
- BRUSILOW S. W., HORWICH A. L. (1989): Urea cycle enzymes. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds.), *The metabolic basis of inherited disease*. 6th edn., Vol.1, New York: McGraw-Hill, Inc., 1989, 629–663.
- BRUSH P. J., ANDERSON P. H., GUNNING R. F. (1987): Identification of Factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain. *The Veterinary Record*, 121, 14–17.
- BRYAN L., SCHMUTZ S., HODGES S. D. AND SNYDER F. F. (1990): Bovine  $\beta$ -mannosidase deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*, 173, 491–495.
- BUCHANAN M., CRAWSHAW W. M. (1995): Bovine congenital erythropoietic protoporphyria in a pedigree Limousin heifer. *The Veterinary Record*, 136 (25), 640. Doi:10.1136/vr.136.25.640.

- BUITKAMP J., SEMMER J, GÖTZ K. U. (2011): Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor dyntesis step 1 gene (*MOCSI*). *BioMed Central Genetics*, 12, 11. Doi:10.1186/1471-2156-12-11.
- BUITKAMP J., KÜHN C., SEMMER J. AND GÖTZ K. U. (2009): Assignment of the locus for arachnomelia syndrome to bovine chromosome 23 in Simmental cattle. *Animal Genetic*, 40 (6), 894–899. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01933.x.
- BUITKAMP J., LUNTZ B., EMMERLING R., REICHENBACH H. D., WEPPERT M., SCHADE B., MEIER N., GÖTZ K. U. (2008): Syndrome of arachnomelia in Simmental cattle. *BioMed Central Veterinary Research*, 4, 39. Doi:10.1186/1746-6148-4-39.
- BURDITT L. J., CHOTAI K., HIRANI S., NUGENT P. G., WINCHESTER B. G. AND BLAKEMORE W. F. (1980): Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. *The Biochemical journal*, 189, 467–473.
- BURNS G. L., MEYERS K. M. AND PRIEUR D. J. (1984): Secondary amyloidosis in bull with Chediak–Higashi syndrome. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48 (1), 113–114.
- COLLIER L. L., PRIEUR D. J. AND KING E. J. (1984): Ocular melanin pigmentation anomalies in cats, cattle, mink, and mice with Chediak–Higashi syndrome: histologic observations. *Current Eye Research*, 3, 1241–1251.
- COOMBER B. L., GALLIGAN C. L., GENTRY P. A. (1997): Comparison of in vitro function of neutrophils from cattle deficient in plasma factor XI activity and from normal animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58, 121–131.
- CRAWFORD A. M., DODDS K. G., MCEWAN J. C. (2000): DNA Markers, genetic maps and the identification of QTL: General principles. In: Axford R. F.E., Bishop s.c., Nicholas F. W. and Owen J.B. (eds.), *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. 2nd edn., New York: CAB International Publishing, 2000, 3–26. ISBN 0-85199-325-7.
- CRAWLEY A. C., JONES M. Z., BONNING L. E., FINNIE J. W. AND HOPWOOD J. J. (1999): Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders. *Pediatric Research*, 46, 501–509.
- CZARNIK U., GALIŃSKI M., ZABOLEWICZ, T., PAREEK CH. S. (2007a): Study of SNP 775C>T polymorphism within the bovine *ITGB2* gene Polish Black-and White cattle and in local breeds of cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 52 (3), 57–61.

- CZARNIK U., GALIŃSKI M., PAREEK CH. S., ZABOLEWICZ T., WIELGOSZ-GROTH Z. (2007b): Study of an association between SNP 775C>T within the bovine *ITBG2* gene and milk performance traits in Black and White cows. *Czech Journal of Animal Science*, 52 (1), 1–6.
- Czarnik U., Grzybowski G., Kamiński S., Prusak B., Zabolewicz T. (2007c): Effectiveness of a program aimed at the elimination of BLAD-carrier bulls from Polish Holstein-Friesian cattle. *Journal of applied genetics*, 48, 375–377.
- ČMSCH, (2011): Plemenní býci, jejichž dcery nemohou být vybírány jako matky pro odchov plemenných býků. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. [online]: cmsch.cz. [cit. 18.8.2011]. Dostupný na: <[www.cmsch.cz/store/byci\\_dcery\\_ne\\_mb.xls](http://www.cmsch.cz/store/byci_dcery_ne_mb.xls)>.
- ČMSCH, (2010): Letální faktory u skotu a jejich mezinárodní symboly. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. [online]: cmsch.cz. [cit. 2.1.2011]. Dostupný na: <[www.cmsch.cz/store/letalni\\_faktory\\_skot.xls](http://www.cmsch.cz/store/letalni_faktory_skot.xls)>.
- ČMSCH (2005): Laboratoř Imunogenetiky – skot, testy nabízené pro skot. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. [online]: cmsch.cz. [cit. 10.10. 2011]. Dostupný na: <<http://www.cmsch.cz/laborator-imunogenetiky-skot/>>.
- ČMSCH (2004): Nabídka testu CVM. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. [online]: cmsch.cz. [cit. 10.9. 2011]. Dostupný na: <<http://www.cmsch.cz/store/nabidka-testu-cvm.pdf>>.
- DANCIS J., LAVITZ M. (1978): Abnormalities of branched chain amino acid metabolism. In : Stanbury J. B., Wyndgaarden D. S., Fredrickson D. S. (eds.), *The metabolic basis of inherited disease*. 4th edn., New York: Mc Graw-Hill Book Co, 1978, 397–407.
- DANNER D. J. AND ELSAS L. J. (1989): Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds.), *The metabolic basis of inherited disease*. 6th edn., Vol.1, New York: McGraw-Hill, Inc., 1989, 671–692.
- DE LEO VA, POH-FITZPATRICK M., MATHEWS-ROTH M., HARBER L. C. (1976): Erythropoietic protoporphyria. 10 years experience. *American Journal of Medicine*, 60, 8–22.
- DENNIS J. A., HEALY P. J. AND REICHMANN K. G. (2002): Genotyping Brahman cattle for generalised glycogenosis. *Australian Veterinary Journal*, 80 (5), 286–291.
- DENNIS J. A., HEALY P. J. (2001): Genotyping Shorthorn cattle for generalised glycogenosis. *Australian Veterinary Journal*, 79 (11), 773–775.

- DENNIS J. A., MORAN C., HEALY P. J. (2000): The bovine alpha-glucosidase gene: coding region, genomic structure, and mutations that cause bovine generalized glycogenosis. *Mammalian Genome*, 11 (3), 206–212.
- DENNIS J. A., HEALY P. J. (1999): Definition of mutation responsible for maple syrup urine disease in Poll Shorthorns and genotyping Poll Shorthorns and Poll Herefords for maple syrup urine disease alleles. *Research in Veterinary Science*, 67 (1), 1–6.
- DENNIS J. A., HEALY P., BEAUDET A. L., O'BRIEN W. E. (1989): Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 7947–7951.
- DENNIS S. M., LEIPOLD H. W. (1970): Syndactylism in a neonatal lamb. *Cornell Veterinarian*, 60, 23–27.
- DODD P. R., WILLIAMS S. H., GUNDLACH A. L., HARPER P. A. W., HEALY P. J., DENNIS J. A., JOHNSTON G. A. R. (1992): Glutamate and gamma - Aminobutyric Acid Neurotransmitter Systems in the Acute Phase of Maple Syrup Urine Disease and Citrullinemia Encephalopathies in Newborn Calves. *Journal of Neurochemistry*, 59, 582–590.
- DODS W. J. AND KULL J. E. (1971): Canine Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 78, 746–752.
- DRÖGEMÜLLER C., TETENS J., SIGURDSSON S., GENTILE A., TESTONI S., LINDBLAD T. K., LEEB T. (2010): Identification of the Bovine Arachnomelia Mutation by Massively Parallel Sequencing Implicates Sulfite Oxidase (SUOX) in Bone Development. *PLoS Genet*, 6(8), e1001079. Doi: 10.1371/journal.pgen.1001079.
- DRÖGEMÜLLER C., ROSSI M., GENTILE A., TESTONI S., JÖRG H., STRANZINGER G., DRÖGEMÜLLER M., GLOWATZKI-MULLIS M. L., LEEB T. (2009): Arachnomelia in Brown Swiss cattle maps to chromosome 5. *Mammalian Genome*, 20, 53–59.
- DRÖGEMÜLLER C., LEEB T., HARLIZIUS B., TAMMEN I., DISTL O., HÖLTERSINKEN M., GENTILE A., DUCHESNE A., EGGEN A. (2007): Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genetic*, 8, 5. Doi: 10.1186/1471-2156-8-5.
- DUCHESNE A., GAUTIER M., CHADI S., GROHS C., FLORIOT S., GALLARD Y., CASTE G., DUCOS A., EGGEN A. (2006): Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics*, 88, 610–621.

- DUNCAN R. B. JR., CARRIG C. B., AGERHOLM J. S., BENDIXEN CH. (2001): Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. Brief communications. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, 333–336.
- DYRENDHAHL I. AND GUSTAVSSON I. (1979): Sexual functions, semen characteristics and fertility of bulls carrying the 1/29 chromosome translocation. *Hereditas*, 90 (2), 281–289.
- ELDRIDGE F. E., SMITH W. H. AND MCLEOD W. M. (1951): Syndactylism in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Heredity*, 42 (5), 241–250.
- FAOSTAT (2011): Statistical Yearbook of the food and Agricultural. Food and Agriculture Organization, of the United Nations. [online]: FAO.org [cit. 23.7. 2013]. Dostupný na: <<http://www.fao.org/docrep/017/i3138e/i3138e07.pdf>>.
- FAIGLE W., RAPOSO G., TENZA D., PINET V., VOGT A.B., KROPSHOFFER H., FISCHER A., DE SAINT-BASILE G., AMIGORENA S. (1998): Deficient peptide loading and MHC class II endosomal sorting in a human genetic immunodeficiency disease, the Chediak–Higashi syndrome. *Journal of Cell Biology*, 141 (5), 1121–1134.
- FRAZER K. A., BALLINGER D. G., COX D. R., HINDS D. A., STUVE L. L., GIBBS R. A. - International HapMap Consortium (2007): A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449 (7164), 851–861. doi: 10.1038/nature06258
- FRIDERICI K., JONES M. Z., CHEN H., CAVANAGH K. T. (1998): Bovine  $\beta$ -mannosidase nucleic acid sequence, US Patent 5837836. Board of Trustees Operating Michigan State University. [online]: google.com. [cit. 12.1. 2009]. Dostupný na: <<http://www.google.com.gh/patents/US5837836>>.
- FRIES R., RUVINSKY A. (1999): *The Genetics of Cattle*. 1st edn., Wallingford: CAB International, 710. ISBN 0851992587.
- GAUR U., SATHE T.G. ROY A., PATEL R.K, SUNKARA P. S. S. (2013): First case of genetic polymorphism in Uridine Monophosphate Synthase gene in an Indian Holstein bull. *International Journal of Veterinary Science*, 2 (1), 32–34.
- GENTRY P. A., ROSS M. L. (1994): Coagulation Factor XI Deficiency in Holstein Cattle: Expression and Distribution of Factor XI Activity. *Canadian Veterinary Journal*, 58 (4), 242–247.
- GENTRY P. A. (1984): The relationship between factor XI coagulant and factor XI antigenic activity in cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 48 (1), 58–62.

- GENTRY P. A., BLACK W. D. (1980): Prevalence and inheritance of factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in cattle. *Journal of Dairy Science*, 63 (4), 616–620.
- GENTRY P. A. AND DOWNIE H. G. (1977): Blood coagulation. In: Swenson M. J. eds., *Duke's physiology of domestic animals*. 9th ed., New York: Cornell University Press, Ithaca, 1977, 41–50.
- GENTRY P. A., CRANE S., LOTZ F. (1975): Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, 16, 160–163.
- GERARDI A. S. (1996): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency: A brief overview of a modern disease and its implications. *Folia Veterinaria*, 40, 65–69.
- GHANEM M. E., AKITA M., SUZUKI T., KASUGA A. AND NISHIBORI M. (2008): Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. *Animal Reproduction Science*, 103 (3), 348–354.
- GHANEM M. E., NISHIBORI M., NAKAO T., NAKATANI K., AKITA M. (2005): Factor XI mutation in a Holstein cow with repeat breeding in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 67 (7), 713–715.
- GHOLAP P. N., KALE D. S. AND SIROTHIA A. R. (2014): Genetic Disease in Cattle: a review. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* 2 (2), 24–33.
- GIBBS R. A., JEREMY F. TAYLOR J. F., VAN TASSELL C. P. – Bovine HapMap Consortium (2009): Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science*, 324 (5926), 528–532. Doi: 10.1126/science.1167936.
- GOTO S., TANIGUCHI M., MURAOKA M., TOYODA H., SADO Y., KAWAKITA M. AND HAYASHI, S. (2001): UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nature Cell Biology*, 3, 816–822.
- GOURREAU J. M., VANDER MASSEN L., BRAQUE R. (1998): Le défaut d'adhérence des leucocytes chez les bovins (BLAD). *Le Point Vétérinaire*, 29, 67–74.
- GRUPE S., DIETL G., SCHWERIN M. (1996): Population survey of citrullinemia on German Holstein. *Livestock Production Science*, 45, 35–38.
- GURGUL A., RUBIŚ D., SŁOTA E. (2009): Identification of carriers of the mutation causing coagulation factor XI deficiency in Polish Holstein-Friesian cattle. *Journal of Applied Genetics* 50, 149–152.

- GUSTAVSSON I., ROCKBORN G. (1964): Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. *Nature*, 203, 990.
- GRZYBOWSKI G. (2003): Zespół zniekształceń kregosłupa: jego konsekwencje w hodowli bydła = Complex vertebral malformation and its implication for cattle breeding. *Medycyna Weterynaryjna*, 59, 107–111.
- GRZYBOWSKI G., GRZYBOWSKI T., WOZNIAK M., CHACINSKA-BUCZEK I., SMUDA E., LUBIENIECKI K. (1998): Badania przesiewowe na obecność genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS u bydła w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna*, 54, 189–193.
- GRZYBOWSKI G., ŻURKOWSKI M., KURYŁ J., GRODZICKA M. (1994): Prevalence of the D128G station (BLAD) in the Polish cattle population. *Animal Genetics*, 25, 61.
- HAEGER-ARONSEN B. (1963): Erythropoietic protoporphyria. A new type of inborn error of metabolism. *American Journal of Medicine*, 35, 450–454.
- HARLIZIUS B., SCHRÖBER S., TAMMEN I., SIMON D. (1996): Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 113, 303–309.
- HARPER P. A. W., HEALY P. J., DENNIS J. A. AND BROWN G. K. (1989): Maple syrup urine disease in calves: a clinical, pathological and biochemical study. *Australian Veterinary Journal*, 66, 46–49.
- HARPER P. A. W., HEALY P. J., DENNIS J. A., O'BRIEN J. J., RAYWARD D. H. (1986a): Citrullinemia as a cause of neurological disease in neonatal Friesian calves. *Australian Veterinary Journal*, 63, 378–379.
- HARPER P. A. W., HEALY P. J. AND DENNIS J. A. (1986b): Ultrastructural findings in maple syrup urine disease in Poll Hereford calves. *Acta Neuropathologica*, 71, 316–320.
- HART E. L., LEIPOLD H. W. AND BAKER R. (1987): Hereditary bovine syndactyly: Diagnosis in bovine fetuses. *Veterinary Pathology*, 24, 140–147.
- HARTLEY W. J. AND BLAKEMORE W. F. (1973): Neurovisceral storage and dysmyelinogenesis in neonatal goats. *Acta Neuropathologica*, 25, 325–333.
- HATINA J., SYKES B. (1999): *Lékařská genetika - Problémy a přístupy*. 1. vydání, Praha: Academia, 296 s. ISBN 80-200-0700-8.



- HATON B. M., BEEVER J. E., ROBINSON J. L. (2000): Mutation that causes factor XI deficiency in Holstein cattle. Dairy Cattle Illinois Livestock Trail by University of Illinois extension. Published 2000-12-4 Dostupný na:  
<<http://livestocktrail.illinois.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=332>>.
- HEALY P. J., MALMO J. (1998): Roles for biochemical and polymerase chain reaction technologies in diagnosis and control of bovine alpha-mannosidosis. *Australian Veterinary Journal*, 76 (10), 699–700.
- HEALY P. J. (1996): Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *Journal of Animal science*, 74, 917–922.
- HEALY P. J., DENNIS J. A. (1995): Heterozygote detection for maple syrup urine disease in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 72, 346–348.
- HEALY P. J., DENNIS J. A., HARPER P. A. W., GRAHAM R., REUTER R. E. (1991): Maple Syrup Urine Disease in Poll Shorthorn Calves. *Australian Veterinary Journal*, 69, 143–144.
- HEALY P. J., HARPER P. A. W. AND DENNIS J. A. (1990a): Bovine citrullinaemia: a clinical, pathological, biochemical and genetic study. *Australian Veterinary Journal*, 67, 255–258.
- HEALY P. J., HARPER P. A. W AND DENNIS J. A. (1990b): Phenotypic variation in bovine  $\alpha$ -mannosidosis. *Research in Veterinary Science*, 49, 82–84.
- HEALY P. J. (1981): Modified granulocyte test for determination of mannosidosis genotype of cattle. *Research in Veterinary Science*, 30 (3), 281–283.
- HEIKINHEIMO P., HELLAND R., LEIROS H. K., LEIROS I., KARLSEN S., EVJEN G., RAVELLI R., SCHOEHN G., RUIGROK R., TOLLERSRUD O. K., MCSWEENEY S., HOUGH E. (2003): The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *Journal of Molecular Biology*, 327 (3), 631–644.
- HERS H. G., VAN HOOFF F., DE BARSEY T. (1989): Glycogen storage disease. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds.), *The metabolic basis of inherited disease*. 6th edn., Vol.1, New York: McGraw-Hill, Inc., 1989, 425–452.
- HERZ J. (2001) The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron*, 29, 571–581.
- HERZOG A., HOHN H. AND OLYSCHLAGER F. (1982): Autosomal trisomy in calves with dwarfism. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 89, 400–403.

- HERZOG A., HOHN H. AND RIECK G. V. (1977): Survey of recent situation of chromosome pathology in different breeds of German cattle. *Annales de Génétique et Sélection Animale*, 9, 471–491.
- HIGASHI O. (1954): Congenital gigantism of peroxidase granules. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 59 (3), 315–332.
- HOWELL J. MCC., DORLING P. R., COOK, R. D., ROBINSON W. F., BRADLEY S., GAWTHORNE J. M. (1981): Infantile and late onset form of generalized glycogenosis type II in cattle. *Journal of Pathology* 134, 266–277.
- HUIZING M., ANIKSTER Y. AND GAHL W. A. (2001): Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 86, 233–245.
- HRADIL R. (1994): Application of molecular genetic methods to the BLAD and PSS testing in bovine and pigs in Czech Republic (in Czech). In: XXIV International Conference on Animal Genetics, Prague, 83–84.
- CHARLIER C., FARNIR F., BERZI P., VANMANSHOVEN P., BROUWERS B., VROMANS H., GEORGES M. (1996): Identity – by descent mapping of recessive traits in livestock: Application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. *Genome Research*, 6, 580–589.
- CHEDIAK M. (1952): Nouvelle anomalie leucocytaire de caractere constitutionnel et familial. *Expert Review of Hematology*, 7, 362–367.
- CHEN H., LEIPPRANDT J. R., TRAVISS CH. E., SOPHER B. L., JONES M. Z., CAVANAGH K. T., FRIDERICI K. H. (1994): Molecular Cloning and Characterization of Bovine  $\beta$ -Mannosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (8), 3841–3848.
- CHESTER A. M., LUNDBLAD A., ÖCKERMAN P.A AND AUTIO S. (1982): Mannosidosis. In: Durand, P. and O'Brien, J., (eds.) *Genetic errors of glycoprotein metabolism*. Berlin: Springer-Verlag, 1982, 89–121.
- CHU Q., SUN D., YU Y., ZHANG Y. AND ZHANG Y. (2008): Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20 (2), 228–230.
- IBEAGHA A. E. M., KGWATALALA P., IBEAGHA A. E. AND ZHAO X. (2008): A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19, 226–245.

- ISHIDA N. AND KWAKITA M. (2004): Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Plügers Archiv: European journal of physiology*, 447, 768–775.
- JAKUBEC V., ŘÍHA J., MAJZLÍK I., BJELKA M. (2003): *Teorie a praxe selekce hospodářských zvířat*. 1. vydání, Rapotín: Asociace chovatelů masných plemen skotu v Rapotíně s podporou MZe ČR., 154 s. ISBN 80-903143-2-5.
- JANSEN S., AIGNER B., PAUSCH H., WYSOCKI M., ECK S., BENET-PAGÈS A., GRAF E., WIELAND T., STROM T. M., MEITINGER T., FRIES R. (2013): Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. *BMC Genomics*, 14, 446. Doi:10.1186/1471-2164-14-446.
- JENKINS M. M., LE BOEUF R. D., RUTH G. R. AND BLOOMER J. R. (1998): A novel stop codon mutation (X417L) of the ferrochelatase gene in bovine protoporphyria, a natural animal model of the human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basic of disease*, 1408 (1), 18–24.
- JOHNSON E. B., STEFFEN D. J., LYNCH K. W., HERZ J. (2006): Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics*, 88 (5), 600–609.
- JOHNSTONE A. C., MC SPORRAN K. D., KENNY J. E., ANDERSON I. L., MACPHERSON G. R., JOLLY R. D. (2004): Myophosphorylase deficiency (glycogen storage disease Type V) in a herd of Charolais cattle in New Zealand: confirmation by PCR-RFLP testing. *New Zealand Veterinary Journal*, 52 (6), 404–408.
- JOLLY R. D. (2002): Screening for genetic diseases in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 80 (5), 284–285.
- JOLLY R. D., VAN-DE-WATER N. S., RICHARDS R. B., DORLING P. R. (1977): Generalized glycogenosis in beef Shorthorn cattle-heterozygote detection. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 55, 141–150.
- JONES M. Z., RATHKE E. J. S., GAGE D. A., COSTELLO C. E., MURAKAMI K., OHTA M. AND MATSUURA F. (1992): Oligosaccharides accumulated in the bovine beta-mannosidosis kidney. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15 (1), 57–67.

- JONES M. Z., CUNNINGHAM J. G., DADE A. W., ALESSI D. M., MOSTOSKY U. V., VORRO J. R., BENITEZ J. T. AND LOVELL K. L. (1983): Caprine beta-mannosidosis: clinical and pathological features. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 42 (3), 268–285.
- JONES M. Z. AND DAWSON G. (1981): Caprine beta-mannosidosis. Inherited deficiency of beta-D-mannosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (10), 5185–5188.
- JØRGENSEN J. N., MADSEN P. (1997): Genetic parameters for and BLAD effects on beef production traits and diseases frequency. *Acta agriculturae Scandinavica Section A – Animal Science*, 47, 1–8.
- JØRGENSEN C. B., AGERHOLM J. S., PEDERSEN J., THOMSEN P. D. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein-Friesian Cattle. I. PCR Screening and Allele Frequency Estimation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34 (3), 231–236.
- KAMINSKI S., GRZYBOWSKI G., PRUSAK B., RUŚĆ A. (2005): No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. *Journal of Applied Genetics*, 46: 395–397.
- KANAE Y., ENDOH D., NAGAHATA H., HAYASHI M. (2005): A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 258–262.
- KAPLAN J., DE DOMENICO I., WARD D. M. (2008): Chediak- Higashi syndrome. *Current Opinion in Hematology*, 15 (1), 22–29.
- KAWASHIMA S., SHIRAISHI M., FUJISHIRO T., FUKUYAMA K. AND ITO K. (2001): Different mechanisms responsible for collagen-induced activation of human and bovine platelets. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85, 179.
- KEHRLI M. E., SHUSTER D. E., ACKERMANN M. R. (1992): Leukocyte Adhesion Deficiency Among Holstein Cattle. *The Cornell Veterinarian*, 82, 103–109.
- KLEIJER W. J., HU P., THOOMES R., BOER M., HUIJMANS J. G. M., BLOM W., VAN DIGGELEN O. P., SEEMANOVA E. AND MACEK M. (1990): Beta-mannosidase deficiency: heterogeneous manifestation in the first female patient and her brother. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13, 867–872.
- KLETT M. (1997): Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 105 (4), 19–23.

- KNOWLER C., GIGER U., DODDS W. J., BROOKS M. (1994): Factor XI deficiency in Kerry Blue Terriers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 1557–1561.
- Kociba G. D., Ratnoff O. D., Loeb W. F., Wall R. I., Heider L. E. (1969): Bovine thromboplastin antecedent (factor XI) deficiency. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 74 (1), 37–41.
- KONERSMANN Y., WEMHEUER W., BRENIG B. (2003): Origin, distribution and relevance of the CVM defect within the Holstein-Friesian population. *Zuechtungskunde*, 75, 9–15.
- KÖNIG H., GAILLARD C., CHAVAZ J., HUNZIKER F., TONTIS A. (1987): Prüfung von Schweizer Braunvieh-Bullen auf das vererbte Syndrom der Arachnomelie und Arthrogrypose (SAA) durch Untersuchung der Nachkommen im Fetalstadium. *Tierärztliche Umschau*, 42, 692–697.
- KUHN M. T., SHANKS R. D. (1994): Association of Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase with Production and Reproduction. *Journal of Dairy Science*, 77 (2), 589–597.
- KUNIEDA M., TSUJI T., ABBASI AR., KHALAJ M., IKEDA M., MIYADERA K., OGAWA H., KUNIEDA T. (2005): An insertion mutation of bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mammalian Genome*, 16 (5), 383–389.
- KUNIEDA T., IDE H., NAKAGIRI M., YONEDA K., KONFORTOV B., OGAWA H. (2000): Localization of the locus responsible for Chediak–Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. *Animal Genetics*, 31 (2), 87–90.
- KUNIEDA T., NAKAGIRI M., TAKAMI M., IDE H., OGAWA H. (1999): Cloning of bovine LYST gene and identification of missense mutation associated with Chediak–Higashi syndrome of cattle. *Mammalian Genome* 10, 1146–1149.
- KUO W-L., HIRSCHHORN R., HUIE M. L., HIRSCHHORN K. (1996): Location and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*, 97, 404–406.
- LAYER G., REICHELT J., JAHN D. AND HEINZ D. W. (2010): Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science*, 19 (6), 1137–1161. Doi: 10.1002/pro.405.
- LEIPOLD H. W. AND STEFFEN D. (1989): Syndrome of arachnomelia and arthrogryposis (SAA) in Brown Swiss calves. *Brown Swiss Bulletin*, September 1989, 86–87.
- LEIPOLD H. W., DENNIS S. M., HUSTON K., DAYTON A. D. (1974): Hereditary bovine syndactyly. II. Hyperthermia. *Journal of Dairy Science*, 57 (11), 1401–1409.

- LEIPOLD H. W., DENNIS S. M AND HUSTON K. (1973): Syndactyly in cattle. *Veterinary Bulletin*, 43, 399–403.
- LEIPOLD, H. W., DENNIS, S. M. (1972): Syndactyly in a pig. *Cornell Veterinarian*, 62, 269–273.
- LEIPOLD H. W., HUSTON K., TROTTER D. M., DENNIS S. M. AND GUFFY M. M. (1969): Anatomy of hereditary bovine syndactylism. I. Osteology. *Journal of Dairy Science*, 52 (9): 1422–1431.
- LEIPPRANDT J. R., CHEN H., HORVATH J. E., QIAO X. T., JONES M. Z., FRIDERICI K. H. (1999): Identification of a bovine beta-mannosidosis mutation and detection of two beta-mannosidase pseudogenes. *Mammalian Genome*, 10 (12), 1137–1141.
- LEVADE T., GRABER D., FLURIN V., DELISLE M. B., PIERAGGI M. T., TESTUT M. F., CARRIÈRE J. P. AND SALVAYRE R. (1994): Human  $\beta$ -mannosidase deficiency associated with peripheral neuropathy. *Annals of Neurology*, volume 35 (1), 116–119.
- LUBIENIECKI K., GRZYBOWSKI G., ŁUKASZEWICZ M., LUBIENIECKA J. (1999): Association between the presence of allele BL in the genome of dairy cows and their productivity. *Animal Science Papers and Reports*, 17, 189–194.
- LI J., WANG H., ZHANK Y., HOU M., ZHONH J., ZHANG Y. (2011): Identification of BLAD and citrullinaemia carriers in Chinese Holstein cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 29 (1), 37–42.
- LIDAUER M., ESSL A. (1994): Estimation of the frequencies for recessive lethal genes for Spinal Muscular Atrophy; Arachnomelia and Weaver in Austrian Braunvieh population. *Zuchtungskunde*, 66 (1), 54–65.
- LIPTRAP R. M., GENTRY P. A., ROSS M. I., CUMMINGS F. (1995): Preliminary findings of altered follicular activity in Holstein cows with coagulation factor XI deficiency. *Veterinary Research Communication*, 19, 463–471.
- LOVELL K. L., JONES M. Z., PATTERSON J., ABBITT B. AND CASTENSON P. (1991): Thyroid structure and function in bovine beta-mannosidosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14 (2), 228–230.
- LOVELL, K. L., AND JONES, M. Z. (1983): Distribution of central nervous system lesions in beta-mannosidosis. *Acta Neuropathologica*, 62 (1–2), 121–126.
- MA J. Z., CUI Y. D., ZHU Z. B., CAO H. W. AND PIAO F. Z. (2006): Investigation on bovine leukocyte adhesion deficiency. *Yi Chuan*, 28 (10), 1233–1236.

- MAGNUS I. A., JARRETT A., PRANKERD T. A. J. (1961): Erythropoietic protoporphyria: a new porphyria syndrome with solar urticaria due to portoporphyrimanea. *Lancet*, 2, 448–451.
- MANKTELOW B. W., HARTLEY, W. J. (1975): Generalized glycogen storage disease in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 85, 139–145.
- MARRON B. M., ROBINSON J. L., GENTRY P. A., BEEVER J. E. (2004): Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 35 (6), 454–456.
- MATSUI T., KURODA S., MIZUTANI M., KIUCHI Y., SUZUKI K., ONO T. (1983): Generalized Glycogen Storage Disease in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Veterinary Pathology*, 20, 312–321.
- MAXWELL H. S., NETTLETON P., KIRKLAND P. (2012): Overview of Congenital and Inherited Anomalies. [online]: The Merck Veterinary Manual [published, March 2012]. Dostupný na: [http://www.merckvetmanual.com/mvm/zk/generalized\\_conditions/congenital\\_and\\_inherited\\_anomalies/overview\\_of\\_congenital\\_and\\_inherited\\_anomalies.html#v3272472](http://www.merckvetmanual.com/mvm/zk/generalized_conditions/congenital_and_inherited_anomalies/overview_of_congenital_and_inherited_anomalies.html#v3272472).
- MCARDLE B. (1951): Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clinical Science*, 10, 13–33.
- MCMULLEN B. A., FUJIKAWA K., DAVIE E. W. (1991): Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains. *Biochemistry*, 30 (8), 2056–2060.
- MCMURRAY W. C., MOHYUDDIN F., ROSSITER R. J., RATHBUN J. C., VALENTINE G. H., KOEGLER S. J., ZARFAS D. E. (1962): Citrullinuria: a new aminoaciduria associated with mental retardation. *Lancet*, 1, 138.
- MEYDAN H., YILDIZ M. A., AGERHOLM J. S. (2010): Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 56. Doi:10.1186/1751-0147-52-56.
- MEYDAN H., YILDIZ M. A., ÖZDİL F., GEDIK Y., ÖZBEYAZ C. (2009): Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51 (1), 5. Doi: 10.1186/1751-0147-51-5.

- MIYAKE Y. I., MURAKAMI R. K., KANEDA Y. (1991): Inheritance of the Robertsonian Translocation (1/21) in the Holstein-Friesian Cattle. I. Chromosome analysis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 53 (1), 113–116.
- MOMMAERTS W. F. H. M., ILLINGWORTH B., PEARSON C. M., GUILLORY R., SERAYDARIAN K. (1959): A functional disorder of muscle associated with the absence of phosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45 (6), 791–797.
- MOSTAFA I. E. (1970): A case of glycogenic cardiomegaly in a dog. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 11 (2), 197–208.
- MOTYČKA J., VACEK M., ŠLEJTR J., CHLÁDEK G., VONDRÁŠEK L. ML., PAZDERA J. (2005). Šlechtění holštýnského skotu. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, Praha, 87 s. [publikováno, 20.1.2006]. Dostupný na: <<http://www.holstein.cz/index.php/test-docman/lechni/179-lechni-holtynskeho-skotu/file>>.
- MURAKAMI H., TAKAGI A., NONAKA M., ISHIURA S, SUGITA H. (1980): Type II. glycogenesis in Japanese quail. *Experimental Animals*, 29, 475–485.
- NAAB HOLSTEIN ASSOCIATION USA (2001): Complex vertebral malformation (CVM). National Association of Animal Breeders – Holstein Association USA, [online]: Naab Electronic Resource Guide News Release. [publikováno, 28.9.2001]. Dostupný na: <<http://www.naab-css.org/education/CVMpressrelease-D.html>>.
- NCBI (2015): Resources Genome – *Bos taurus* (cattle) U.S National Library of Medicine [online]: National Center for Biotechnology Information – Genome [cit. 24.5. 2015]. Dostupný na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/82> >.
- NCBI (2014): Resources Gene – *Bos taurus* (cattle) U.S National Library of Medicine [online]: National Center for Biotechnology Information – Genome [cit. 4.2. 2014]. Dostupný na: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Bos+taurus+%28cattle%29> >.
- NCBI (2009): ASS1 argininosuccinate synthase 1 - *Bos taurus* (cattle). U.S National Library of Medicine [online]: National Center for Biotechnology Information – Gene. [cit. 12.8. 2009]. Dostupný na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280726>>.



- NAGAHATA H., MIURA T., TAGAKI K., OTHAKE M., NODA H., YASUDA T., NIKOKA K. (1997): Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 59, 233–238.
- NAGAHATA H., HATAKEYAMA K., NODA H., NOCHI H., TAMOTO K. (1994): Two cases of Holstein calves with bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) (Case report). *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 101 (2), 53–56.
- NAGAHATA H., NOCHI H., TAMOTO K., TANIYAMA H., NODA H., MORITA M., KANAMAKI M., KOCIBA G. J. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Holsten Cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57 (4), 255–261.
- NAGLE D. L., KARIM M. A., WOOLF E. A., HOLMGREN L., BORK P., MISUMI D. J., MCGRIL S. H., DUSSAULT B. J. JR., PEROU CH. M., BOISSY R. E., DUYK G. M., SPRITZ R. A. AND MOORE K. J. (1996): Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak–Higashi syndrome. *Nature Genetics*, 14 (3), 307–311.
- NATONEK M. (2000): Identyfikacja mutacji BLAD u bydla metoda PCR-RFLP. *Biuletyn Informacyjny*, 38 (4), 29–33.
- NIELSEN U. S., AAMAND G. P., ANDERSEN O., BENDIXEN C., NIELSEN V. H., AGERHOLM J. S. (2003): Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livestock Production Science*, 79 (2–3), 233–238.
- NOROUZY A. M., NASSIRY F. E. S., JAVADMANESH A., SHAHRODY F. E., ABDI M. R. M. AND SULIMOVA G. E. (2005): Identification of bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. *Genetika*, 41 (12), 1697–1701.
- OGAWA H., TU C. H., KAGAMIZONO H., SOKI K., INOUE Y., AKATSUKA H., NAGATA S., WADA T., IKEYA M., MAKIMIRA S., UCHIDA K., YAMGUCHI R., OTSUKA H. (1997): Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak–Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 58 (11), 1221–1226.
- OHBA Y., TKASU M., NISHII N., TAKEDA E., MAEDA S., KUNIEDA T., KITAGAWA H. (2007): Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 297–299.

- OLSON T. (2002): New genes: Good and Bad. Florida Dairy Production Conference. In: Complete Proceedings of the 39th Annual Dairy Production Conference, April 30-May 1, 2002 [online]. University of Florida IFAS Extension [cit. 14.5. 2007]. Dostupný na: <<http://dairy.ifas.ufl.edu/dpc/2002/Olson.pdf>>.
- OMIA (2014): OMIA HOME. Online Mendelian Inheritance in Animals, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, [online]: [omia.angis.org.au](http://omia.angis.org.au). [cit. 20.11. 2014] Dostupný na: <<http://omia.angis.org.au/home/>>.
- OSTEN-SACKEN A. (2004): Defekty genetyczne u bydla. Holenderska Genetyka Plus Sp. z o.o. [online]: Holenderska Genetyka Plus, [published, 5/2004]. Dostupný na: <[http://www.hgplus.pl/artykuly/PrzeглядHodowlany/PH\\_5\\_2004.pdf](http://www.hgplus.pl/artykuly/PrzeглядHodowlany/PH_5_2004.pdf)>.
- O'SULLIVAN B. M., HEALY P. J., FRASER I. R., NIEPER R. E., WHITTLE R. J., SEWELL C. A. (1981): Generalised glycogenosis in Brahman Cattle. Australian Veterinary Journal, 57 (5), 227–229.
- O'TOOLE D., MONTGOMERY D. L., STEADMAN L., O'ROURKE B., RUSSELL W., DENNIS J. (2005): Status spongiosus of white matter in newborn Gelbvieh-cross calves. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17, 546–553.
- ÖCKERMAN P. A. (1967): A generalised storage disorder resembling Hurlers syndrome. Lancet, 2: 239
- PALMER D. G., DORLING P. R., HOWELL J. MCC. (1994): Bovine glycogenosis type II: the molecular defect in Shorthorn cattle. Neuromuscular Disorders, 4 (1), 39–48.
- PAREEK C. S., KAMINSKI S. (1996): Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and its worldwide prevalence. Journal of Applied Genetics, 37 (3), 299–311.
- PATEL R. K., SINGH K. M., SONI K. J., CHAUHAN J. B. AND SAMBASIVA RAO K. R. (2007): Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian cattle and buffalo breeds. Journal of Applied Genetics, 48 (2), 153–155.
- PATEL R. K., SINGH K. M., SONI K. J., CHAUHAN J. B., SAMBASIVA RAO K. R. (2006): Lack of carriers of citrulinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. Journal of Applied Genetics, 47 (3), 239–242.
- PAZDERA J. (2001): CVM-letální porucha u skotu. Náš chov, 4, 23–24.

- PENNER J. D. AND PRIEUR D. J. (1987): A comparative study of the lesions in cultured fibroblasts of humans and four species of animals with Chediak–Higashi syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 28 (2), 445–454.
- PEROU C. M., MOORE K. J., NAGLE D. L., MISUMI D. J., WOOLF E. A., MCGRAIL S. H., HOLMGREN L., BRODY T. H., DUSSAULT B. J. JR., MONROE C. A., DUYK G. M., PRYOR R. J., LI L., JUSTICE M. J., KAPLAN J. (1996): Identification of the mouse beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nature Genetics*, 13 (3), 303–308.
- PETERSEN M. B., SLAUGENHAUPT S. A., LEWIS J. G., WARREN A. C., CHAKRAVARTI A., ANTONARAKIS S. E. (1991): A genetic linkage map of 27 markers on human chromosome 21. *Genomics*, 9 (3), 407–419.
- PFARR N., BORCK G., TURK A., NAPIONTEK U., KEILMANN A., MÜLLER-FORELL W., KOPP P. AND POHLENZ J. (2006): Goitrous Congenital Hypothyroidism and Hearing Impairment Associated with Mutations in the TPO and *SLC26A4/PDS* Genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91 (7), 2678–2681.
- PLACHOT M. AND POPESCU C. P. (1991): Les anomalies chromosomiques et géniques. Leurs conséquences sur le développement et la reproduction. In: Thibault, E. C. and Levasseur, M.C.(eds.). *Reproduction chez les Mammifères*. Ellipses, Paris, 1991, 687–712.
- PLEMDAT (2014): Rutinní zpracování chovatelských a plemenářských dat; Interaktivní webové aplikace, Plemdat, s.r.o., [online]: plemdat.cz. [cit. 6.6. 2014]. Dostupný na: <http://test.plemdat.cz/cgi-bin/kdb-hlav.exe>.
- POLI M. A., DEWEY R., SEMORILE L., LOZANO M. E., ALBARINO C. G., ROMANOWSKI V., GRAU O. (1996): PCR Screening for Carriers of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Argentine Holstein Cattle. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A.*, 43 (3), 163–168.
- POPESCU C. P. (1990): Chromosomes of the cow and bull. In: McFeely R. A. (eds.), *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Vol. 34, San Diego: Academic Press, 41–71.
- POWELL R. L., NORMAN H. D., COWAN C. M. (1996): Relationship of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency with Genetic Merit for Performance Traits. *Journal of Dairy Science*, 79 (5), 895–899.

- PRITCHARD D. J., KORF B. R. (2003): *Medical Genetics at a Glance*. Blackwell Science, Oxford; *Základy lékařské genetiky*. 1. české vydání, Praha: Vydavatelství Galén, 2007, 182 s. ISBN 978-80-7262-449-2
- RAJESH K. P., KALPESH J. S., JENABHAI B. C., KRISHNA M. S., KROTHAPALLI R. S., SAMBASIVA R. (2007): Factor XI deficiency in Indian *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbreds and *Bubalus bubalis*. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3), 580–583.
- RENOY B. P., BALLIGAND M. (1991): A Case of Syndactylous Dog. *Annales de Medicine Veterinaire*, 135, 43–44.
- REVELL S. (2001): Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *The Veterinary Record*, 24, 659–660.
- RIBEIRO L. A., BARON E. E., MARTINEZ M. L., COUTINHO L. L. (2000): PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 831–834.
- RIECK G. W. AND SCHADE W. (1975): Arachnomelia (spider limbs), a new hereditary fatal malformation syndrome of cattle. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 82 (9), 342–347.
- RICKETTS M. H., SIMONS M. J., PARMA J., MERCKEN L., DONG Q., VASSART G. (1987): A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *The Proceedings of the National Academy of Sciences online (US)*, 84 (10), 3181–3184.
- RICKETTS M. H., SCHULZ K., VAN ZYL A., BESTER A. J., BOYD C. D., MEINHOLD H., VAN JAARSVELD P. P. (1985): Autosomal recessive inheritance of congenital goiter in Afrikaner cattle. *Journal of Heredity*, 76 (1), 12–16.
- RICHARDS R. B., EDWARDS J. R., COOK R. D., WHITE R. R. (1977): Bovine generalized glycogenosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 3 (1), 45–56.
- ROBINSON J. L., BURNS J. L. MAGURA C. E., SHANKS R. D. (1993a): Low Incidence of Citrullinemia Carriers Among Dairy Cattle of the United-States. *Journal of Dairy Science* 76 (3), 853–858.
- ROBINSON J. L., POPP R. G., SHANKS R. D., OOSTERHOF A., VEERKAMP J. H. (1993b): Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein-Friesian cattle of North America and Europe. *Livestock Production Science*, 36 (4), 287–298.

- ROBINSON J. L. AND SHANKS R. D. (1990): Review: The inherited deficiency of uridine monophosphate synthase in dairy cattle. *Journal of Chinese Agricultural Association of Students and Scholars* 1, 1–5.
- ROSSI M., BERGAMINI P. F., GENTILE A. (2008): Studio clinico genetico di nuove malattie ereditarie del bovino. [Dissertation thesis], Alma Mater Studiorum Università di Bologna. Dottorato di ricerca in Diagnostica collaterale in medicina interna veterinaria, 20 Ciclo. Doi: 10.6092/unibo/amsdottorato/739.
- RUŚĆ A., HERING D., PUCKOWSKA P., BARCEWICZ M., KAMIŃSKI S. (2013): Screening of Polish Holstein-Friesian bulls towards eradication of complex vertebral malformation (CVM) carriers. *Polish journal of Veterinary Sciences*, 16 (3), 579–581.
- 
- RUŚĆ A., KAMINSKI S. (2007): Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetic*, 48 (3), 247–252.
- RUTH G. R., SCHWARTZ S., STEPHENSON B. (1977): Bovine protoporphyria: the first nonhuman model of this hereditary photosensitizing disease. *Science Magazine*, 198 (4313), 199–201.
- RUTTEN V. P. M. G., HOEK A., MÜLLER K. E. (1996): Identification of monoclonal antibodies with specificity to  $\alpha$  - or  $\beta$  - chains of  $\beta$ 2-integrins using peripheral blood leucocytes of normal and Bovine Leucocyte Adhesion Deficient (BLAD) cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 52 (4), 341–345.
- ŘEHOUT V., ČÍTEK J., SÁKOVÁ L. (2000): *Genetika I (Úvod do studia genetiky)*. 1. vydání, České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 256 s., ISBN 80-7040-405-1.
- SANDSTROM B., WESTMAN J., ÖCKERMAN P. A. (1969): Glycogenesis of the central nervous system in the cat. *Acta Neuropathologica*, 14 (3), 194–200.
- SAMBRAUS H. H. (2006): *Atlas plemen hospodářských zvířat*. 1. české vydání, Praha: Nakladatelství Brázda, 295 s., ISBN 80-209-0344-5.
- SEICHTER D., RUSS I., FÖRSTER M., MEDUGORAC I. (2011): SNP-based association mapping of Arachnomelia in Fleckvieh cattle. *Animal Genetic*, 42 (5), 544–547.
- SELIGSOHN U. (1978): High gene frequency of factor XI (PTA) deficiency in Ashkenazi Jews. *Blood*. Jun; 51(6), 1223–1228.

- SHANKS R. D. AND GREINER M. M. (1992): Relationship between genetic merit of Holstein bulls and deficiency of uridine-5'-monophosphate synthase. *Journal of Dairy Science*, 75 (7), 2023–2029.
- SHANKS R. D. AND ROBINSON J. L. (1990): Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein cattle. *Cornell Veterinarian*, 80, 119–122.
- SHANKS R. D., BRAGG D. ST. A. AND ROBINSON J. L. (1987): Deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle: Inheritance and body measurements. *Journal of Animal Science*, 64, 695–700.
- SHANKS R. D., DOMBROWSKI D. B., HARPESTAD G.W., ROBINSON J. L. (1984): Inheritance of UMP synthase in dairy cattle. *Journal of heredity*, 75 (5), 337–340.
- SHIBUYA H., NONNEMAN D., TAMASSIA M., ALLPHIN O. L., JOHNON G. S. (1995): The coding sequence of the bovine ferrochelatase gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1231 (1), 117–120.
- SHIOZAWA M., MIYAZAWA T., KOEDA T., TAKAHASHI M., FUJIWARA H. (1995): Protoporphyrin disorder in livers of broiler chickens, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57 (3), 549–551.
- SHIRAISHI M., OGAWA H., IKEDA M., KAWASHIMA S. AND ITO K. (2002): Platelet Dysfunction in Chediak-Highashi Syndrome-Affected Cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64 (9), 751–760.
- SHUSTER D. E., BOSWORTH B. T., KERHLI M. E. (1992a): Sequence of the CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene*, 114,267–271.
- SHUSTER D. E., KEHRLI M., ACKERMANN M., GILBERT R. (1992b): Identification and prevalence of a genetic defect that cause leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *The Proceeding of the National Academy of Sciences online (US)*, 89 (19), 9225–9229.
- SHELCHER F., DELVERDIER M., BEZILLE P., CABANIE P. AND ESPINASSE J. (1991): Observation on bovine congenital erythrocytic protoporphyria in the blonde d'Aquitaine breed. *The Veterinary Record*, 129 (38), 403–407.
- SCHMUTZ S. M., MOKER J. S., LEIPPRANDT J. R., FRIDERICI K. H. (1996): Beta-mannosidase maps to cattle chromosome 6. *Mammalian Genome*, 7 (6), 474.

- SCHÜTZ E., SCHARFENSTEIN M. AND BRENIG B. (2008): Implication of Complex Vertebral Malformation and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency DNA-Based Testing on Disease Frequency in the Holstein Population. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 4854–4859.
- SCHWENGER B., TAMEN I., AURICH C. (1994): Detection of the homogenous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 511–514.
- SCHWENGER B., SCHRÖBER S., SIMON D. (1993): DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics*, 16 (1), 241–244.
- SOETHOUT E. C., VERKAAR E. L. C, JANSEN G. H. MÜLLER K. E. AND LENSTRA J. A. (2002): A Direct *StyI* Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFLP) Test for Myophosphorylase Mutation in Cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49 (6), 289–290.
- SRŠEŇ Š., SRŠŇOVÁ K. (2005): *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. 4. vydanie, Martin: Vydavateľstvo Osveta, 445 s, ISBN 80-8063-185-9.
- STANĚK S., DOLEŽAL O., ZINEK V. (2012): Jak lépe a efektivně odchovávat telata?. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. - Praha [online]: VUZV/Aktuality/2012. [cit. 29.11. 2012]. Dostupný na: <<http://www.vuzv.cz/sites/File/Aktuality/2012/Stan%C4%9Bk.pdf>>.
- STÖPPLER M. C. (2014): Genetic Disease Overview. [online]: Medicine Net. [published 7.12.2014]. Dostupný na: <[http://www.medicinenet.com/genetic\\_disease/article.htm#what\\_is\\_a\\_genetic\\_disease](http://www.medicinenet.com/genetic_disease/article.htm#what_is_a_genetic_disease)>.
- SUN Y., GAILANI D. (1996): Identification of a factor IX binding site on the third apple domain of activated factor XI. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (46), 29023–29028.
- SUN Y., WOLFE J. H. (2001) Recent progress in lysosomal alpha-mannosidase and its deficiency. *Experimental and Molecular Medicine*, 33, 1–7.
- SCHHS ČR (2009): Býci se známým statusem pro CVM – registrovaní. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o.s. [online]: holstein.cz. [cit. 28.8.2009]. Dostupný na: <<http://www.holstein.cz/index.php/component/search/>>.
- ŠÍPEK A. (2012): Teratogeny. *Genetika- Biologie*. [online]: genetika-biologie.cz, [cit. 28.8.2013]. Dostupný na: <<http://www.genetika-biologie.cz/teratogeny>>.
- ŠLEJTR J. (2002): Mulefoot nebo syndaktylie u holštýnského skotu. *Náš chov*, 6, 29.

- ŠMARDÁ J., DOŠKÁŘ J., PANTUČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J. (2008): *Metody molekulární biologie*. 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita, 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- TAMMEN I., LARSSON U., BERGKNUT N., BARENDSE W., MORAN C. AND DENNIS J. A. (2000): Physical and linkage mapping of the bovine acidic alpha-glucosidase gene to chromosome 19, *Animal Genetic*, 31 (4), 285–286.
- TAMMEN I., KLIPPERT H., KUCZKA A., TREVIRANUS A., STOEBER M., SIMON D. AND HARLIZIUS B. (1996): An improved DNA test for bovine leucocyte adhesion deficiency. *Research in Veterinary Science*, 60 (3): 218–221.
- TAMMEN I. (1994): Weiterentwicklung des DNA-Tests auf BLAD [Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz] für den Einsatz in Rinderzucht und klinischer Diagnostik. [Dissertation]. Tierärztliche Hochschule Hannover, 1–127.
- TAINTURIER D., GROBET L., BROUWERS B., BRUYAS J. F., FIENI F., BATTUT I., LECOANET J., DOUART A., BREYTON I., DUCLOS P. (1995): Observations on three cases of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). *Revue de Medecine Veterinaire*, 146 (3), 189–195.
- TAN P., ALLEN J. G., WILTON S. D., AKKARI P. A., HUXTABLE C. R., LAING N. G. (1997): A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscular Disorders*, 7 (5), 336–342.
- TESTONI S., GENTILE A. (2006): Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slovenian Veterinary Research*, 43 (1), 17–29.
- TESTONI S., GENTILE A. (2004): Arachnomelia in four Italian Brown calves. *The Veterinary Record*, 155 (12): 372.
- THOMAS G. H. AND BEAUDET A. L. (1995): Disorders of glycoprotein degradation and structure:  $\alpha$ -mannosidosis,  $\beta$ -mannosidosis, fucosidosis, sialidosis, aspartylglucosaminuria, and carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. and Valle D., (eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th edn., vol. 2, New York: McGraw-Hill, Inc., 1995, 2529–2561.
- THOMSEN B., HORN P., PANITZ F., BENDIXEN E., PETERSEN A. H., HOLM L. E., NIELSEN V. H., AGERHOLM J. S., ARNBIERG J., BENDIXEN C. (2006): A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research*, 16 (1), 97–105.



- TOLLERSRUD O. K., BERG T., HEALY P., EVJEN G., RAMACHANDRAN U., NILSSEN Ø. (1997): Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutation that cause alpha-mannosidosis. *European Journal of Biochemistry*, 246 (2), 410–419.
- TROWALDWIGH G., HAKANSSON L., JOHANNISSON A., NORRGREN L., SEGERSTAD C. H. (1992): Leucocyte Adhesion Protein Deficiency in Irish-Setter Dogs, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32: 261–280.
- TSUJINO S., SHANSKE S., VALBERG S. J., CARDINET G. H., SMITH B. P. AND DI MAURO S. (1996): Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromuscular Disorders*, 6 (1), 19–26.
- TU CH, TAKAHASHI Y., KASEDA Y., UCHIDA K., YAMAGUCHI R., SUZUKI K. (1996): Inheritance of Chediak–Higashi syndrome in Japanese black cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58 (6), 501–504.
- VAN PELT J., HOKKE C. H., DORLAND L., DURAN M., KAMERLING J. P. AND Vliegenthart J. F. G. (1990): Accumulation of mannosyl-beta(1-4)-N-acetylglucosamine in fibroblasts and leukocytes of patients with a deficiency of beta-mannosidase. *Clinica Chimica Acta*, 187 (1), 55–60.
- VANRADEN P. M., OLSON K. M., NULL D. J., HUTCHISON J. L. (2011): Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*, 94 (12), 6153–6161.
- VIANA J. L., FERNANDEZ A., IGLESIAS A., SANTAMARINA G. (1998): Diagnóstico y kontrol de las principales enfermedades genéticas (citrulinemia, DUMPS y BLAD) descritas en ganado Holstein-Frisón. *Medicine Veterinary*, 15, 538–544.
- WATANABE D., HIRANO T., SUGIMOTO Y., OGATA Y., ABE S., ANDO T., OHTSUKA H., KUNIEDA T., KAWAMURA S. (2006): Carrier Rate of Factor XI Deficiency in Stunted Japanese Black Cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68 (12), 1251–1255.
- WEBER A. F., BUOEN L. C., ZHANG T. Q. (1992): Prevalence of 14/20 centric fusion chromosomal aberration in US Simmental cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200 (9), 1216–1219.

- WENGER D. A., SUJANSKY E., FENNESSEY P. V. AND THOMPSON J. N. (1986): Human beta-mannosidase deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 315 (19), 1201–1205.
- WHITTEM J. M. AND WALKER D. (1957): „Neuropathy“ and „pseudolipidosis“ in Aberdeen Angus calves. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 74, 281.
- WINDSOR P. A., AGERHOLM J. S. (2009): Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Australian Veterinary Journal*, 87 (5), 193–199.
- ZABEK T., RYS A. (1998): Gene defect in farm animals. *Biuletyn Informacyjny Instytut Zootechniki*, 36 (4), 5–13.
- ZENDULKA M., ŠKARDA R. A KOL. (1987): *Patologická anatomie hospodářských zvířat. 1. vydání*, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 688 s. ISBN 07-060-87.
- ZHANG B., HEALY P. J., CRABB D. W. AND HARRIS R. A. (1990): Premature translation termination of the pre-E1 $\alpha$  subunit of the branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase as a cause of Maple Syrup Urine Disease in Polled Hereford Calves. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (5), 2425–2427.
- ZIMIN A. V., DELCHER A. L., FLOREA L., KELLEY D. R., SCHATZ M. C., PUIU D., HANRAHAN F., PERTEA G., VAN TASSELL C. P., SONSTEGARD T. S., MARÇAIS G., ROBERTS M., SUBRAMANIAN P., YORKE J. A. AND SALZBERG S. L., (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10 (4), R42. Doi: 10.1186/gb-2009-10-4-r42.
- ZLOTOWSKI P., NAKAZATO L., DUTRA V., BARROS S. S., GIMENO E. D., GOCKS M., COLODEL E. M., DRIEMEIER D. (2005): Inherited glycogenosis in Brahman cattle in Brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 25 (2), 210–214.

## 8.2. Seznam literatury s již publikovanými výsledky

- ČÍTEK J., VEČEREK L. (2014): Health in Contemporary Cattle Breeding. *Slovak Journal of Animal Science*, 47 (4), 188–192.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., SCHRÖFFELOVÁ D., HANUSOVÁ L., HOSNEDLOVÁ B., MÍKOVÁ A., VEČEREK L., JAŠKOVÁ I., PŘIBÁŇOVÁ M. (2013): Dědičné poruchy zdraví u býků v České Republice. *Veterinářství*, 63, 41–45.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., HANUSOVÁ L., VRABCOVÁ P. (2008): Sporadic incidence of factor XI deficiency in Holstein cattle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2069–2072.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., HRADECKÁ E., HANUSOVÁ L., VEČEREK L. (2008): Organizační postupy pro odhalování skrytých přenašečů geneticky podmíněných poruch zdraví. Uplatněná metodika, Vydání 1., České Budějovice. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 1–33. Vypracované v rámci výzkumného záměru č. MSM 6007665806. ISBN 978-80-7394-152-9.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., SCHRÖFFELOVÁ D., HRADECKÁ E. (2008): Frequency of BLAD and CVM alleles in sires and elite heifers of Czech Holstein cattle. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 115, 475–477.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., VEČEREK L., HÁJKOVÁ J. (2007): Genotyping Glycogen Storage Disease II and Type V in Cattle Reared in the Czech Republic, *Journal of Veterinary Medicine*, 54, 257–259.
- VEČEREK L., HOSNEDLOVÁ B., ČÍTEK J. (2007): Restrikční analýza genu pro BLAD. In: VII<sup>th</sup> international Conference of PhD. and MSc. Students. Genetika a šlechtění zvířat. MZLU Brno, 44-49. ISBN 978-80-7375-053-4.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., HÁJKOVÁ J., PÁVKOVÁ J. (2006): Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Veterinární Medicína*, 51, 333–339.
- ČÍTEK J., ŘEHOUT V., HRADECKÁ E., VEČEREK L. (2006): Komplex vertebrálních malformací v populaci černostrakatého dkotu v ČR. *Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in České Budějovice, Series for Animal Sciences*, 23 (1), 25–28.

## 9. Přílohy

Příloha 1:

Mezinárodní nomenklatura letálních faktorů skotu (ČMSCH, 2010)

Číslo	název	číslo	Název
A1	Achondroplasia I.	A2	Epitheliogenesis
A3	Achondroplasia II.	A4	Hypotrichosis-congenita
A5	Acroteriasis congenita	A6	Mumifikace
A7	Obrna zadních končetin	A8	Kontraktury svalstva
A9	Ankyloza čelisti	A10	Zkrácení páteře
A11	Ljutikovův letální faktor	A12	Ascites - vrozená vodnatelnost - hydrops universalis
A13	Všeobecné ankylozy a zkrácení kloubů	A14	Anomálie molárů
A15	Mikromelie – achondroplastické zkrácení končetin	A16	Atresia ani
A17	Anomálie končetin, arthrogryposis	A18	Hernia cerebralis
A19	Brachygnathia inferior	A20	Agnathia - syndrom
A21	Antimaskulinní letální faktor	A22	Nevyvinutí nosních otvorů
A23	Nevyvinutí falangových článků	A24	Hydrocephalus
A25	Vrozená spasmofilie a ataxie	A26	Prodloužená březost I.
A27	Prodloužená březost II.	A28	Pruhovitá alopecie
A29	Achondroplasia III.	A30	Vrozená porfyrinurie
A31	Dysfunkce štítné žlázy	A32	Ichthyosis congenita
A33	Anodontia	A34	Aplasia předního laloku hypofýzy - aplasia pars anterior hypofýzy
A35	Kontraktury svalstva	A36	Dědičná obrna pánevních končetin
A37	Snížený počet obratlů	A38	Polycythemia rubra vera
A39	Atresia ilei	A40	Proptocephalie
A41	Rozštěp páteře	A42	Abort
A43	Parakeratóza		

Příloha 2:

## **Opatření Svazu chovatelů holštýnského skotu ČR k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR**

1. Na základě doporučení mezinárodních organizací (WHFF – World Holstein Friesian Federation a EHRC – European Holstein and Redholstein Confederation) a v souladu s postupy uplatňovanými v zahraničních holštýnských populacích jsou údaje o genetických vadách evidovány v plemenných knihách.
2. Informaci o vyšetření zvířete a zjištění vady, resp. vyloučení vady sděluje plemenné knize majitel býka, dovozce semene, majitel nebo dovozce embrya či majitel plemence.
3. Majitel zvířete, embrya, dovozce semene zodpovídá za správnost informací sdělených plemenné knize o nositelství, resp. vyloučení nositelství dědičných vad.
4. Vzhledem ke genetické podstatě dědičných vad slouží k prokázání, resp. vyloučení nositelství genetické vady molekulárně-genetické metody.
5. Dokladem o nositelství, resp. vyloučení vady jsou výsledky testů daného jedince nebo jeho rodičů, event. rodokmenová analýza.
6. Seznam vad, které jsou v současné době sledovány, testovány a evidovány je uveden v příloze
7. Povinné je zjišťování, evidování a zveřejňování údajů u závažných genetických vad u plemenných býků pro inseminaci a u dovezeného semene.
8. Ostatní vady eviduje plemenná kniha na žádost majitele zvířete, případně na žádost dovozce spermatu nebo embrya
9. Za závažné jsou považovány vady:  
  
BLAD – Bovine leukocyte adhesion deficiency  
CVM - Complex vertebrae malformation
10. V souladu se šlechtitelským programem stanoví Svaz následující opatření k tlumení a dalšímu snižování frekvence výskytu BLAD a CVM v populaci holštýnského skotu v ČR.
  - a) Vybírání a zařazování na ISB mohou být býci holštýnského plemene pouze s negativním vyšetřením, tj. u BLAD se statutem TL a u CVM se statutem TV; vyšetření býka může být nahrazeno negativním vyšetřením jeho rodičů a dokladem o ověření původu pomocí DNA
  - b) Konzervované sperma plemenných býků, kteří jsou nositeli BLAD (status BL), resp. CVM (status CV) může být používáno za předpokladu, že se jedná o býky prověřené kontrolou dědičnosti a zapsané v plemenné knize v ČR. Majitel býka,

dovozce semene a inseminační technik jsou povinni informovat chovatele, že se jedná o býka nositele uvedené genetické vady.

- c) Chovatelé i pracovníci servisních organizací dbají, aby spermatem těchto býků nebyly inseminovány plemence se shodným statusem (BL, CV) nebo podezřelé z nositelství BLAD, resp. CVM.
- d) Pro přirozenou plemenitbu mohou být používáni býci bez známého statusu BLAD a CVM. V případě prodeje jinému majiteli je prodávající povinen zajistit stanovení statusu (testování) pokud o něj kupující požádá.

Opatření nabývá účinnosti 1. 1. 2004

Dokument je dostupný na: <http://www.holstein.cz/index.php/test-docman/lechni/112-opateni-svazu-k-eliminaci-ddinych-vad/file>