

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vlivu markeru CGIL4 na obsah somatických buněk v mléce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph. D.

Autor diplomové práce: Bc. Nikola Mojžíšková

České Budějovice, 2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola MOJŽÍŠKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z16309**  
Studijní program: **N4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Zootechnika**  
Název tématu: **Studium vlivu markeru CGIL4 na obsah somatických buněk v mléce**  
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Jedním z významných problémů v chovu skotu je i výskyt mastitid. Jejím důsledkem není jen zhoršení zdravotního stavu, ale i snížení produkce a zvýšení nákladů na veterinární péči. Průvodním znakem výskytu mastitidy je zvýšený obsah somatických buněk v mléce. Plemenná hodnota pro počet somatických buněk se v současné době využívá jako indikátor náchylnosti či odolnosti vůči mastitidě. Existuje celá řada studií zaměřená na nalezení potenciálního genetického markeru se vztahem k výše uvedenému znaku. Jedním z nadějných kandidátních lokusů je i lokus označovaný jako CGIL4.

Cílem diplomové práce je provést analýzu výskytu jednotlivých genotypů v lokusu CGIL4 v dané populaci a ověřit vztah mezi genotypem v daném lokusu a počtem somatických buněk v mléce.

V úvodu krátce popište mastitidu jako onemocnění, jehož průvodním znakem je zvýšený obsah somatických buněk v mléce. Uveďte její příznaky, diagnostiku, možné původce a léčbu. Zaměřte se především na faktory, zapříčiňující její vznik. Kromě faktorů vnějších neopomeňte ani faktory vnitřní - zejména genetické. Popište potenciální genetický marker CGIL4 a jeho vliv na obsah somatických buněk v mléce. V praktické části diplomové práce nejprve sestavte populaci dojnic s odlišným výskytem mastitid. U jednotlivých zvířat zaznamenejte počty somatických buněk v mléce při pravidelných kontrolách. U populace proveďte odběr mléka. Z mléka vyizolujte DNA a následně genotypizujte vzorky pro lokus CGIL4. Z výsledků genotypizace spočítejte genotypové a alelické frekvence. Statisticky vyhodnoťte potenciální vztah mezi genotypem v daném lokusu a počtem somatických buněk v mléce jako ukazateli náchylnosti k mastitidám. Vaše poznatky porovnejte s poznatky jiných autorů, zabývajících se podobným tématem. V závěru shrňte získané poznatky a uveďte chovatelská doporučení pro omezení výskytu mastitid v chovech.

Rozsah grafických prací: 3 - 5 tabulek, 1 - 3 obrázky

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Sakthivel Selvan A., Gupta I.D., Verma A., Chandhari M.V., Magotra A. (2016): Molecular characterization and combined genotype association study of bovine cluster of differentiation 14 gene with clinical mastitis in crossbred dairy cattle. *Vet World*, 9(7), 680-684.

De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDOugall S., Barkema H.W. (2012): Mastitis in dairy heifers: nature of disease, potential impact, prevention and control. *J Dairy Sci*, 95(3), 1025-1040.

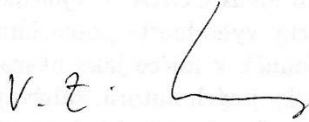
Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. (2009): Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*, 40(6), 832-851.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

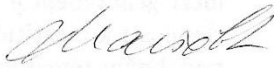
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 22. března 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2018

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studenty 1668, 370 05 České Budějovice

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 22. března 2017

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: .....

Podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych ráda věnovala poděkování především mé vedoucí práce paní Ing. Lence Hanusové, Ph.D., za její ochotu, vřelost a cenné rady při vypracování diplomové práce.

Mé díky patří paní také Ing. Veronice Čoudkové za pomoc při statistickém vyhodnocení této práce a paní Ing. Blaženě Šťouralové předsedkyni ZOD Předslavice, za možnost odběru vzorků mléka z jejich chovu a poskytnutí dat.

## **Abstrakt**

Cílem studie bylo provést analýzu výskytu jednotlivých genotypů v lokusu CGIL4 v dané populaci skotu. Analýza proběhla u plemen holštýnského a českého strakatého skotu. Byl ověřen vztah mezi genotypem v daném lokusu a počtem somatických buněk v mléce. Zvýšený počet somatických buněk je hlavním indikátorem při vzniku mastitid. V diplomové práci byly popsány faktory zapříčiňující jejich vznik. V praktické části se provedl odběr vzorků mléka u vybrané populace dojnic obou plemen. Z mléka se vyizolovala DNA a následně se genotypizovaly vzorky pro lokus CGIL4. Z výsledků genotypizace se spočetly genotypové a alelické frekvence. Na závěr se potenciální vztah mezi genotypem v daném lokusu a počtem somatických buněk v mléce vyhodnotil statisticky.

**Klíčová slova:** genetika, lokus, mastitida, somatické buňky

## **Abstract**

The aim of the study was to analyze the occurrence of individual genotypes in the CGIL4 locus in a given cattle population. The analysis was carried out in breeds of Holstein and Czech Pied Cattle. The relationship between the genotype in the given locus and the number of somatic cells in the milk was verified. An increased number of somatic cells is the main indicator of mastitis. The diploma thesis described the factors that provoked their origin. In the practical part, milk samples were taken in a selected cow population of both breeds. The DNA was isolated from the milk and samples for the CGIL4 locus were genotyped. Genetic and allelic frequencies were counted from genotyping results. Finally, the potential relationship between genotype in a given locus and the number of somatic cells in milk was evaluated statistically.

Key words: genetics, locus, mastitis, somatic cells

## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Literární přehled .....</b>	<b>11</b>
3.1. Definice mastitidy .....	11
3.2. Změny složení mléka.....	12
3.3. Formy mastitid .....	14
3.3.1. Klinická forma .....	14
3.3.2. Subklinická forma .....	15
3.3.3. Letní mastitida.....	15
3.4. Vlivy působící na vznik mastitidy.....	16
3.4.1. Infekční vlivy .....	17
3.4.1.1. Původci mastitidy .....	17
3.4.1.2. Typy mastitidy podle původce .....	19
3.4.2. Neinfekční vlivy.....	21
3.4.2.1. Vliv prostředí.....	21
3.4.2.2. Vliv dojení.....	23
3.4.2.3. Vliv výživy .....	26
3.4.2.4. Vliv jedince .....	26
3.4.2.5. Vliv vlastního genetického založení jedince .....	28
3.5. Lokusy spojené s náchylností k mastitidě .....	33
3.5.1. Geny miRNA .....	34
3.5.2. Jednonukleotidové polymorfismy (SNP).....	34
3.5.2.1. CD14 .....	34
3.5.3. Lokusy pro kvantitativní znaky(QTL) .....	35
3.5.4.1. CGIL4 .....	35
3.6. Specifické léčení a zaprahování .....	37
3.7. Preventivní opatření.....	37
3.7.1. Vakcinace proti mastitidě.....	38
3.8. Ztráty způsobené mastitidami.....	38
3.9. Použité metody .....	39
<b>4. Materiál a metodika.....</b>	<b>42</b>
4.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	44
4.3. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) .....	45
4.4. Kontrola izolované DNA, PCR fragmentů a genotypizace - elektroforéza 45	
<b>6. Použitá literatura .....</b>	<b>57</b>
<b>6. Přílohy .....</b>	<b>67</b>



# 1. Úvod

Mastitida je zánětlivé onemocnění mléčné žlázy. Mléčná žláza reaguje na chemické, bakteriální nebo mechanické podněty. Mastitidu může způsobovat hned několik činitelů, ať už fyzikální, chemické nebo biologické povahy. Není možné považovat mastitidu za jednotné onemocnění, jelikož se při jejím vzniku uplatňuje široká škála mikrobiálních původců, řada faktorů neinfekční povahy a klinické projevy se liší v závislosti na formě onemocnění.

Samotné mastitidy nejsou novodobým problémem, chovatele provází od samé domestikace skotu. V současné době se v chovech toto onemocnění vyskytuje nejčastěji a má tak velký vliv na jejich ekonomiku. Vede k předčasnému vyřazení plemenic ze stáda, k nižší intenzitě selekce u jalovic, ke snížení tržnosti mléka, ke zvýšení nákladů na veterinární služby a léčiva, k poklesu dlouhověkosti stáda a poklesu rentability chovu.

Nejčastěji mastitidu charakterizujeme zvýšeným počtem somatických buněk v mléce. Chtějí-li si chovatelé udržet přístup na trh, musí udržovat nízký počet somatických buněk v bazénu a uvědomovat si následky, které mohou nastat u nemocných dojnic. Stanovení přijatelné hranice somatických buněk se stále vyvíjí. Ještě nedávno byl zdravý chov limitován hodnotou 250 000 buněk na mililitr (VELECHOVSKÁ, 2017). Aktuálně lze hovořit o zdravé dojnici se somatickými buňkami do počtu 140 000 na mililitr (URBAN, 2016).

V současné době se jako indikátoru náchylnosti či odolnosti vůči mastitidě využívá plemenné hodnoty pro počet somatických buněk. Existuje celá řada studií zaměřená na nalezení potenciálního genetického markeru se vztahem k počtu somatických buněk. Jedním z nadějných kandidátních lokusů je i lokus označovaný jako CGIL4.

## **2. Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo provést studii lokusu CGIL4, který je jedním z kandidátních lokusů spojených s vysokou hodnotou počtu somatických buněk v mléce a výskytem mastitid u dojnic. Náplní práce bylo provést analýzu genotypů v lokusu CGIL4 v dané populaci a porovnat jednotlivé genotypy s počty somatických buněk v mléce.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Definice mastitidy

Mléko ve vemeni zdravé dojnice obsahuje neškodné zárodky. Jakmile se však začne dojit a mléko přichází do styku s vnějším prostředím – rukou dojiče, dojícím zařízením, se vzduchem a nádobami, začíná se znečišťovat zárodky. Hlavním zdrojem nečistot a následkem toho i rozkladných zárodků jsou země, prach, stelivo, krmivo a hnůj (ANONYM 7, 2016). Vniknou-li do vemene patogeny, postižená tkáň mléčné žlázy na to reaguje obranou reakcí ve formě zánětu. Tak se ve velkých počtech přesouvají leukocyty z krve do alveol, aby patogeny, které pronikly do mléčné žlázy, zničily. Díky působení patogenů dochází k odumírání mlékotvorných buněk, které jsou společně s leukocyty mlékem vylučovány z vemene ven (KESTER *et al.*, 2015). Zánětlivou reakci vemene označujeme jako mastitida.

V průběhu mastitidy však dochází k řadě dalších změn. Různí původci mohou vyvolat stejné, podobné nebo odlišné reakce. Dochází k patologicky-morfologickým změnám mléčné žlázy a k fyzikálně-chemické a mikrobiologické změně mléčného sekretu (KOVÁČ, 2001; HEJLÍČEK, 1987). U mastitidního mléka lze zaznamenat v některých případech smyslové změny. Mléko má žlutou, červenou, nahnědlou či nazelenavou barvu, slanou prázdňovou chuť, hnilobný pach, vodnatou a řidší konzistenci. Pozorovat lze i vysrážení bílkoviny z mléka, oddělení pevné a tuhé fáze (DE OLIVY *et al.*, 2013). Samotná mléčná žláza vykazuje známky zánětu otokem, zčervenáním a citlivostí na dotek. K zánětu se přidružuje i zvýšená teplota zaníceného místa (STANĚK, 2017).

Z pohledu hygienické kvality mléka posuzujeme stav mléčné žlázy podle počtu somatických buněk (PSB) v mléce, především leukocytů. Pouze hodnota PSB do 100 000 v 1 ml mléka je výrazem naprosto zdravé mléčné žlázy. Jakákoli vyšší hodnota předznamenává pravděpodobnost zdravotních problémů (SEYDLOVÁ, 2011). Význam obsahu somatických buněk je zahrnut v tabulce č. 1.

Počet somatických buněk (PSB) v 1 ml mléka	Význam množství somatických buněk v mléce
< 100 000	Zdravé vemeno. Regenerace mléčné žlázy v normě.
< 200 000	Zvýšená imunitní obrana způsobená zvýšeným infekčním tlakem.
< 250 000	Skryté poruchy zdraví vemene.
< 400 000	Imunitní obranná reakce při silně zvýšeném infekčním tlaku.
> 400 000	Zánět vemene.

**Tab. č. 1. – Význam obsahu PSB v mléce skotu (ANONYM 6, 2017).**

V České republice se stanovuje PSB průměrem za tři měsíce z minimálně dvou odběrů měsíčně (MCDOUGALL *et al.*, 2001). Hodnoty od 250 000 PSB mohou signalizovat skryté poruchy vemene. Imunitní obrana je zvýšená, důsledkem toho dochází k většímu odlučování tkáně. Pokud přesáhne hodnota PSB 400 000 v 1 ml, došlo k silnému zánětu (ANONYM 6. 2017).

Zvýšení počtu somatických buněk může být nejenom důsledkem zánětlivého procesu vlivem přítomnosti intramamární infekce, ale také výsledkem fyziologických procesů jiných než patologických, jako je např. říje, pokročilá fáze laktace, stres. Posuzování zdraví vemene na základě hodnot somatických buněk pouze z jednoho měření tedy nemá samo o sobě dostatečnou vypovídající schopnost (MCDOUGALL *et al.*, 2001).

### **3.2. Změny složení mléka**

V tabulce č. 2 jsou uvedeny nejvýznamnější změny složení mléka, které při zvýšeném počtu somatických buněk nacházíme. Tyto změny mají především negativní vliv na následné zpracování mléka a negativní vliv na lidskou výživu.

Složka mléka	Změna	Příčina
pH	↑	Alkalické složky z krve
Titrační kyselost	↓	Alkalické složky z krve
Laktóza	↓	Snížená tvorba
Chloridy	↑	Přechází z krve
Sodík	↑	Přechází z krve
Tuk	↓	Snížená tvorba
Kasein	↓	Snížená tvorba
Bílkoviny celkové	↔	Protiběžné změny složek

**Tab. č. 2 – Změny složení mléka při mastitidě (DE OLIVY *et al.*, 2013).**

Velmi často při diagnostice mastitidy využíváme titrační kyselosti mléka určenou titrací NaOH o 0,25 mol/l<sup>-1</sup>. Standardně se pohybuje v rozmezí 6,2 – 7,8 mmol/l<sup>-1</sup> NaOH. Při výskytu mastitidy titrační kyselost klesá až pod 4 mmol/l<sup>-1</sup>. Mléko je alkalické. Na tomto principu fungují tzv. NK testy diagnostiky mastitid.

Z důvodu snížené schopnosti syntézy poškozené tkáně, ale také z důvodů menší prostupnosti glukózy v důsledku boje o energii mezi sekrečními buňkami a buňkami pohlcující pevné částice z okolí (fagocytující buňky), dochází ke snížení obsahu laktózy a zvyšování obsahu chloridů v mléce (DE OLIVY *et al.*, 2013).

Snížený obsah kaseinu v mléce má za následek narušení poměru Ca a P. Obsah vápníku v mléce výrazně klesá. Mléko obsahuje malé kaseinové micely, které obtížně vytvářejí prostorovou strukturu s vápníkem. Dochází ke špatnému srážení mléka při sýření. Sýřenina obsahuje příliš vody, nedrží pohromadě a snižuje se výrazně výnosnost sýru (LI *et al.*, 2014).

V řadě zaznamenaných případů dochází ke kvalitativním změnám lipidů v mléce. Zvyšuje se jodové číslo a dochází ke zvýšení podílu nízkomolekulárních mastných kyselin. Tyto změny mléčného tuku mohou urychlovat lipolýzu. Problém nastává při zpracování mléka. Pokud se zpracovává mléko na smetanu a následně

na máslo, prodlužuje se doba stloukání a máslo má následkem oxidace nažluklou chuť (SANTOS *et al.*, 2003).

### 3.3. Formy mastitid

Závažnost zánětu lze rozdělit do dvou kategorií: na tzv. subklinickou mastitidu a závažnou klinickou mastitidu (DE VLIEGHER *et al.*, 2012). Včasné rozpoznání mastitidy je velmi důležité. Šance na kompletní uzdravení se po 24 hod. od vzniku snižuje na pouhých 50 % (KESTER *et al.*, 2015).

#### 3.3.1. Klinická forma

Klinická mastitida se zpravidla projevuje zjevnými příznaky, jako je zarudnutí, otok, bolestivost, zvýšená teplota postižené čtvrti vemene (ANONYM 2, 2017), a doprovází ji celkové narušení zdravotního stavu (KESTER *et al.*, 2015). Změny mléka jsou viditelné pouhým okem. V mléce nacházíme vločkovitý sediment nebo se mléko změní v sekret žluté barvy, často i s příměsí krve (DOLEŽAL *et al.*, 2000). Podle závažnosti a průběhu zánětu dělíme klinickou mastitidu na zánět mírného, středního a vysokého stupně (ŠTOSSOVÁ, 2017).

Zánět vysokého stupně je nejzávažnější. Může dojít až ke smrti dojnice, pokud nebude okamžitě léčen. Objevuje se u krav v období krátce po otelení a může být častější u krav, které mívají nízký počet somatických buněk (HILLERTON *et al.*, 2004). Na první pohled je zřetelné, že dojnice strádá. Vykazuje apatii, na vemeni jsou zřetelné změny, včetně otoku, tepla, bolesti, a mléko může vypadat vodnatě, ačkoli bez sraženin (DOLEŽAL *et al.*, 2000).

Je primárně způsoben bakteriemi produkujícími endotoxin, jako je *Escherichia coli*, ačkoli v některých případech může být patogenem *Staphylococcus aureus*.

Zánět mírného a středního stupně může způsobit většina bakterií, mykoplazmat, kvasinek a hub. Kráva není celkově nemocná, pozorujeme abnormální

změny v mléce, zduřenou čtvrt' vemene a známky nepohodlí při chůzi (HILLERTON *et al.*, 2004).

### **3.3.2. Subklinická forma**

Často je výsledkem neléčené či neefektivně léčené klinické mastitidy (KESTER *et al.*, 2015). Na 1 případ klinické mastitidy připadá 30 - 40 případů mastitidy subklinické (LIŠKA, 2006).

U subklinické mastitidy nelze pozorovat zjevné klinické příznaky zánětu vemene. Projevuje se zvýšeným počtem somatických buněk (nad 200 000 somatických buněk v 1 ml mléka) a dochází k poklesu nádoje. Mléko je mírně pozměněné a často je viditelný otok vemene. Na zvířeti ovšem nejsou pozorovatelné další příznaky (KESTER *et al.*, 2015). Ovšem můžeme pozorovat změnu ve fyzikálních vlastnostech mléka: pH, vodivost, obsah chloridů (ANONYM 2, 2017). Jestliže se u krávy vyskytne mastitida, dochází ke zvyšování koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v mléce a ke zvýšení konduktivity mléka ve čtvrtích, které jsou zasaženy (NORBERG *et al.*, 2006). Dále lze mastitidu zaznamenat poklesem mléčného tuku pod 4,5 % (KESTLER *et al.*, 2015) nebo v případě používání pedometrů sníženou aktivitou dojnic (ANONYM 2, 2017).

Ztráty na produkci mléka při 200 - 300 000 somatických buněk v 1 ml se odhadují na 6 - 7% (LIŠKA, 2006). Při zvýšení PSB na 400 000 v ml mléka dochází u jedné dojnice ke snížení užitkovosti asi o 2,1 kg, což ve stádě 100 krav představuje přibližně 200 kg mléka denně (WESTERLAAN, 2013). Většina chovatelů se však začíná více věnovat prevenci mastitid až v případě, kdy jim hrozí snížená cena mléka (LIŠKA, 2006).

### **3.3.3. Letní mastitida**

Ve spojení s tepelným stresem hovoříme o tzv. "letní mastitidě". Jedná se o zánět infekčního charakteru (MELXNER, 2001). Velmi často se vyskytuje u suchostojných krav, ale může se vyskytnout u jalovic a dojnic (HILLERTON *et al.*, 2004).

Projevuje se bez výraznějších makroskopických změn mléka (MELXNER, 2001). Na první pohled se nemění barva, hustota, vůně a nejsou přítomny v mléce vločky. Lze je posoudit smysly (ANONYM 4, 2010). Výskyt letních mastitid signalizuje nárůst počtu somatických buněk v mléce.

Ve Velké Británii potvrdili, že letní mastitidou každoročně trpí 33 – 60 % stáda. V Dánsku i o něco málo více. Podle údajů z roku 1995 je známo celkem 6 druhů choroboplodných bakterií, působících letní mastitidu, z nichž jsou 3 nejvýznamnější. Infekci způsobují *Actinomyces pyogenes* v 70 – 85 % případech, *Peptococcus indolicus* v 60 – 90 % případech a *Streptococcus dysgalactiae* v 20 – 40 % případech (MELXNER, 2001). Tento typ mastitidy je účinkem kombinace několika typů bakterií. Podle kombinace se rozlišuje závažnost klinických příznaků (HILLERTON *et al.*, 2004).

Pro snižování tepelného vlivu je třeba zajistit dojnícím stín, větrání stájí, čekáren i dojíren, úpravu krmné dávky a popřípadě evaporaci (ochlazování vodou) (OSIČKA, 2007; CHLÁDEK *et al.*, 2007).

### **3.4. Vlivy působící na vznik mastitidy**

Záněty mléčné žlázy mohou být vyvolány infekčními a neinfekčními činiteli. Mezi neinfekční vlivy řadíme např. poranění vemene, nekvalitní zaplísňené krmení, stres, způsob dojení (špatné kolísání vakua) nebo metabolické onemocnění (KOLLAR, 2008). Pokud jde o infekční činitele, nejvýznamnějším zdrojem je infikované vemeno. Mikroorganismy způsobující mastitidu se dostávají do mléka, přenášejí se a rozšiřují. Především se přenášejí přes dojicí zařízení, ruce dojiče, podestýlkou, utěrkami, dojačkami atd. Infekci mohou roznést i nadpočetné struky krávy (pastruky), různá hnisavá a infikovaná místa na těle člověka nebo zvířete, především na kůži struků dojnic (LIŠKA, 2006), hnisavé záněty pohlavního aparátu dojnic a hnisavé procesy v oblasti paznehtů krav. Také bodavý hmyz, především mouchy, plní nemalou úlohu v přenosu patogenů vemene (ANONYM 3, 2017).

Po nakažení vemene vzniká skrytá forma zánětu, při které chybí klinické projevy. Další průběh a projev infekce závisí na přirozené odolnosti a obranné



schopnosti krávy, na druhu, množství a virulenci patogenů vemene (VĚŘÍŠ, 2016). Dojnice, které jsou celkově zdravé, mají vůči zánětům vemene vyšší odolnost (OSIČKA *et al.* 2013). Napadne-li vemeno menší počet patogenů, s nízkou virulencí a při dostatečné obranyschopnosti dojnice infekce postupně ustoupí a zvíře se samo uzdraví. Napadne-li mléčnou žlázu větší počet patogenů, případně virulentnější zárodky a obranná schopnost organismu není dostatečná na likvidování infekce vyvine se akutní nebo chronická forma mastitidy (VĚŘÍŠ, 2016). Infekce se mnohdy nekontrolovatelně rozroste a může zasáhnout i celé stádo (DOLEŽAL *et al.*, 2000).

### **3.4.1. Infekční vlivy**

Infekčním vlivem jsou samotné patogeny vyskytující se v prostředí. Mezi původce mastitidy řadíme streptokoky, stafylokoky a koliformní bakterie (ZELÍNKOVÁ, 2017).

U většiny onemocnění dochází k nakažení přes strukový kanálek, velmi zřídka se zánět rozšíří z jiné části těla (ANONYM 2, 2017). Další možností vzniku zánětu vemene je rozšíření infekce z jiných orgánů, nejčastěji ze zánětů dělohy, končetin, včetně přenosu zánětu z jiné čtvrti vemene (ZELINKOVÁ, 2017).

#### **3.4.1.1. Původci mastitidy**

Neexistuje žádný patogen, který by způsoboval pouze mastitidu. Je známo asi 80 bakterií, plísní a kvasinek, které mohou způsobit zánět vemene (DOLEŽAL *et al.*, 2000). Bakteriální infekce vemene vede k zánětu, otoku a způsobuje poškození buněk tvořících mléko (PAZDERA, 2005).

Mastitidy rozdělujeme podle původců na environmentální, kdy patogen žije v prostředí nezávisle na zvířeti, a kontagiozní organismy, závislé na zvířeti (ŠTOSSOVÁ, 2016). V mnoha provozech narůstá počet environmentálních mastitid a zároveň klesá počet kontagiozních mastitid. Kontagiozní zárodky jsou odpovědné za cca 10 % všech klinických mastitid (ILLEK *et al.*, 2014).

## **Environmentální původci**

Environmentální patogeny se vyskytují volně v prostředí. Z tohoto důvodu může dojít k přenosu na vemeno téměř kdykoli. Náchylnost se může zvýšit nedostatečnou očištěnou struků před dojením, leháním krav brzy po dojení, kdy není strukový kanálek ještě zcela uzavřen, nebo nesprávnou aplikací intramamárních přípravků přímo do strukového kanálku (ŠTOSSOVÁ, 2016).

Nejčastějším původcem mastitidy, vyskytujícím se v prostředí, je fekální bakterie *Escherichia coli* (ILLEK *et al.*, 2014). Způsobuje rychlou a závažnou klinickou infekci (ANONYM 3, 2017). Napadá především organismy plemenic, které nemají dostatečně ošetřené vemeno po dojení, především jde o dezinfekci struků (ILLEK *et al.*, 2014). K vniknutí patogenu dochází rovněž díky nedokonale uzavřenému strukovému svěrači prostřednictvím kontaminované podestýlky, přisunutím zakálené končetiny k vemenu, nebo ležením ve výkalech (ANONYM 3, 2017).

Při boji proti patogenům z prostředí musíme zajistit pravidelnou asanaci chovného stájového prostředí a stlaní kvalitní podestýlkou (RYSOVÁ, 2017). V letních měsících představuje riziko tepelný stres, kdy zvířata, zejména pak vysokoužitkové dojnice, mají tendenci se ochlazovat ležením v hnojně chodbě, která je infekčně riziková (ANONYM 3, 2017). Bohužel samotné zlepšení hygieny nemusí snižovat výskyt mastitidy způsobené *E. coli*, protože krávy se stávají stále náchylnější k nemoci (BRADLEY *et al.*, 1998).

Mezi další nejčastěji vyskytující se environmentální původce patří *Streptococcus uberis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus termophilus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermis*, koliformní původci (*Klebsiella*, *Proteus*, aj.) a ostatní (*Bacillus*, *Pseudomonas*, aj.) (ŠTOSSOVÁ, 2016).

## **Kontagiozní původci**

K přenosu kontagiozních patogenů dochází z dojnice na dojnici (ŠTOSSOVÁ, 2016). Patogeny se vyskytují ve velkém počtu v mléčné žláze a masivně se s mlékem vylučují. V prostředí se vyskytuje jen zanedbatelný počet (ILLEK *et al.*, 2014). K přenosu dochází z 90 % během dojení jako důsledek velmi

špatné úrovně hygieny (ANONYM 3, 2017). Většinou se tak děje vinou ošetřovatele, který nedodrží správné postupy hygieny dojení (ILLEK *et al.*, 2014). Takzvaná mokrá hygiena - hadřík, vědro a špinavá voda je bohužel v mnoha chovech realitou. Pro hygienu mléčné žlázy před dojením je vhodnější tzv. suchá hygiena. Tu představuje vlhčená jednorázová utěrka, kdy se 1 utěrka používá pouze pro 1 zvíře. Toto opatření může sloužit jako - prevence šíření mastitidy (ANONYM 3, 2017). Další možný rezervoár nastává neuskutečněním průběžné osobní hygieny dojiče v průběhu procesu dojení (LIŠKA, 2006).

Mezi kontagiozní původce patří *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasmabovis* (ŠTOSSOVÁ, 2016).

#### 3.4.1.2. Typy mastitidy podle původce

Každý vzniklý zánět může mít odlišné projevy v závislosti na patogenu, který ho způsobil. Původce dělíme do základních skupin na stafylokoky, streptokoky a koliformní bakterie.

##### Mastitidy vyvolané stafylokoky

Rod *Staphylococcus* zahrnuje 49 druhů a 26 poddruhů (BRZDIL, 2015). Většina druhů je nepatogenní a tvoří součást přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka i zvířat. Vyskytují se také v půdě nebo v potravinách. Stafylokoky u krav nacházíme v ragádách (prasklinách, poraněních na hrotech struků, vzniklých nesprávnou funkcí dojírny). V případě nedostatečné bariéry strukového kanálku pasážují do mléčné cisterny, kde se pomnoží a napadají sliznice mlékovodů (VĚŘÍŠ, 2016).

Jedná se o akutní až chronické mastitidy, které špatně reagují na léčbu. Mohou vznikat i gaengrenózní změny (odúmrtí) na mléčné žláze. Za následky onemocnění mohou nejčastěji *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus chromogenes*. V České republice častěji vyvolává infekci *Staphylococcus aureus* s prevalencí 10 – 15 % (JAGLIČ *et al.*, 2015).

Léčba se provádí většinou celková - podáváním antibiotik. V lehčích případech se využívá léčba lokální – intramamární (aplikace strukovým kanálkem

do vemene) aplikace antibiotik (ANONYM 3, 2017). Před začátkem terapie se dojnice zasušují (VĚŘÍŠ, 2016).

### **Mastitidy vyvolané streptokoky**

Mezi nejčastěji vyskytující se streptokoky způsobující mastitidu patří *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* a *Streptococcus dysgalactiae*.

Adaptace *S.agalactiae* je specifická tím, že dokáže žít a rozmnožovat se jen v mléčné žláze, kde způsobuje mastitidy. Výzkumy potvrdily, že *Streptococcus agalactiae* se přenáší také odpadním mlékem a při jeho zkrmování telatům. Patogen může žít týdny na krčních mandlích telete. Pokud zkrmujeme mléko infikovaných krav telatům, mohou být telata infikována již první den svého života a za dva roky se otelí již s mastitidou. Tomu může napomoci typ ustájení, kdy telata mají možnost vzájemně si ocucávat základy struků (SCHULTE *et al.*, 2003).

Napadení struků i přes jejich kůži je charakteristické pro patogeny *S. uberis* a *S. dysgalactiae*. K nakažení dochází pouze při nehygienickém dojení. Vzniká fibroza (zmnožení) tkáně a následně postupná involuce (zánik) lalůček, čímž dochází k poklesu nebo ztrátě sekrece mléka (ANONYM 3, 2017).

Nákaza bakterií rodu *S.uberis* se charakterizuje pomalým rozvojem, komplikovanou terapií a častou reinfekcí. V minulosti byl *S.uberis* řazen k environmentálním původcům převážně chronických mastitid. V současné době odlišujeme nový druh *Streptococcus parauberis*. Liší se od *S. uberis* agresivitou a rezistencí vůči antibiotikům, schopností ničit tkáň vemene a náročnější léčbou (VĚŘÍŠ, 2016).

### **Mastitidy vyvolané koliformními bakteriemi**

Mezi koliformní bakterie patří výše popsaná *Escherichia coli*, dále *Escherichia bacter* a ostatní střevní bakterie (ILLEK *et al.*, 2014).

Ve struku bakterie napadají neutrofilny. Zneškodněním bakterií dochází k uvolnění toxinů a následnému zánětu. U akutních a perakutních případů je mléko změněno na hnědavý vodnatý sekret (ANONYM 3, 2017). Terapie se provádí antibiotiky, v závislosti na míře postižení (ILLEK *et al.*, 2014). Po úspěšné léčbě se vše vrací do normálního stavu (ANONYM 3, 2017).

### **Mastitidy vyvolané plísněmi**

Mastitidy mají z 2 – 13 % mykotickou etiologii. S ohledem na malou infekčnost jsou nejčastějším mykotických agens kvasinky rodu *Candida*. Postižena zpravidla bývá jen jedna čtvrt' vemene a obvykle se onemocnění stává chronické. Infikovaná čtvrt' je zarudlá, horká, gumové konzistence. Dochází ke snížení produkce mléka. Zbarvení mléka se mění na našedlé, konzistence se stává vodnatou a cítíme z něj kvasinky (HEJLÍČEK, 1987).

### **3.4.2. Neinfekční vlivy**

Onemocnění mohou vyvolat také neinfekční vlivy. Patří sem vlivy prostředí, především hygiena ustájení, dále vlivy postupů dojení, výživy, specifické léčení, stres, poranění vemene a metabolické onemocnění. Posledním neméně důležitým vlivem je vliv jedince, kde zohledňujeme stáří dojnice, imunitu nebo genetickou predispozici (DE VLIEGHER *et al.*, 2012; ANONYM 2, 2017).

#### **3.4.2.1. Vliv prostředí**

V prostředí se vyskytuje velké množství bakterií, které mohou dojnice infikovat. Pocházejí především z trusu (koliformní zárodky), mohou se množit v podestýlce a vyvolávají těžké klinické záněty vemene. Pokud je oslabena funkce strukového svěrače, mohou se dojnice snáze nakazit tím, že uléhají na znečištěnou podestýlku. Funkce strukového svěrače bývá zhoršena po porodu a u starších krav (ZELINKOVÁ, 2017). Obecně lze říci, že mezi hlavní faktory prostředí s vlivem na výskyt mastitid má technologie ustájení, zvolená podestýlka a čistota zvířat.

### **Technologie ustájení**

Existuje několik významných aspektů ustájení zvířat, které přímo ovlivňují výskyt mastitid (JEŽKOVÁ, 2017a). V žádném období roku by neměly být překročeny doporučené počty zvířat v dané stáji. Každá dojnice potřebuje jeden lehací box v případě stáji s ložnými boxy. Doporučuje se min. 6,5 m<sup>2</sup> ležiště a 2,2 m<sup>2</sup> pohybového prostoru na jedno zvíře ve stájích s nedělenou plochou lože. Pokud

nebude dostatek lůžek, dojnice budou lehat na znečištěnou hnojnou chodbu (VOKŘÁLOVÁ, 2007).

Konstrukce stáji souvisí s výskytem zranění struků. Poranění se nejčastěji vyskytují při ustájení v boxech (JEŽKOVÁ, 2017b). Vhodné konstrukce boxů by měly plnit několik parametrů. Kohoutková zábrana má být ideálně vysoká 122 - 127 cm. Hrudní zábrany by měly být zaobleny a umístěny tak, aby měly výšku 12 - 13 cm (DVORSKÝ, 2007).

Mastitidy se více vyskytují ve volném ustájení s nedělenou plochou lože stlané slámou, oproti ustájení s oddělenými loži (WHITAKER, 2004). Takto jsou nejčastěji ustájené suchostojné krávy. Velká část mastitid vzniká právě na začátku období stání na sucho a před otelením. Čisté a dobře nastlané prostředí ustájovacích prostor pro dojnice stojící a sucho je stejně důležité jako u produkční části stáda (VOKŘÁLOVÁ, 2007).

### **Podestýlka**

Nejnižší výskyt mastitid byl pozorován u farem podestýlajících pískem (VELECHOVSKÁ, 2017; VAN GASTELEN *et al.*, 2011). V nejvíce případech však bývají vysokoprodukční dojnice ustájeny ve stlaných stájích, což podporuje množení patogenů (VELECHOVSKÁ, 2017). Organická podestýlka vytváří lepší podmínky pro množení mikroorganismů než anorganická. Vysoká vlhkost podestýlky může podporovat růst velkého množství bakterií. Cokoli, co zvyšuje obsah vlhkosti nebo množství organických látek v podestýlce, vede k vyšší náchylnosti dojnice k mastitidním patogenům (JEŽKOVÁ, 2017b).

Další vhodnou možností podestýlání jsou piliny ošetřené hydratovaným vápnem, nebo v kombinaci se slámou. Podle studií v Německu vykazují piliny posypané vápnem významně nižší počet bakterií *S. aureus*, *S. uberis* a *E. coli* (PADUCH *et al.*, 2013).

Mezi nevhodné podestýlky pro dojnice patří sušený digestát z bioplynových stanic (ANONYM 1, 2010). Výzkumy potvrdily, že se v sušeném digestátu vyskytují patogeny nejvíce (GODDEN *et al.*, 2008).

Zvolíme-li jakoukoli možnost podestýlání, musíme se držet několika zásad. Podestýlka musí být vždy suchá a čistá, musí fungovat pravidelný odklid hnoje z hnojné chodby i lůžek a být zajištěna ventilace vzduchu (VAN GASTELEN *et al.*, 2011). Vhodné je, aby si dojnice po ukončení dojení do lůžek ihned nelehaly. K uzavření strukového kanálku dochází 30 – 60 min. po dojení a před uplynutím této může dojít k infekci vemene. Nejvhodněji zavedeme krmení ihned po dojení. Dojnice se z dojírny přesouvají nejprve ke krmnému žlabu (RYSOVÁ, 2017; VAN GASTELEN *et al.*, 2011).

### **Čistota zvířat**

Zvýšený důraz na čistotu zvířat a ustájení je nezbytný pro minimalizaci prevalence environmentálních mastitid (JEŽKOVÁ, 2017b). Krávy ustájené ve volných stájích s nedělenou plochou lože podléhají znečištění více než krávy ustájené v lehacích boxech (ELLIS *et al.*, 2007). Ve volných stájích se riziko špinavých vemen zvyšuje 1,8 krát. Mění-li se organická podestýlka méně často než 1 krát denně, zvyšuje se riziko špinavých vemen na 4 krát a v případě přeplnění stáje 10 krát (JEŽKOVÁ, 2017b). Lože s matracemi způsobuje znečišťování vemene, rovněž je tím větší pravděpodobnost ataku mikroorganismů do strukového kanálku. Abychom tomu zabránili, přistýláme zadní část lože slámou či pilinami a mletým vápencem v pruhu 60 cm (DOLEŽAL *et al.*, 2004).

Hygienické skóre vemene lze dobře posoudit během dojení (JEŽKOVÁ, 2017b). Takzvané hodnocení čistoty mléčné žlázy je zahrnuto ve čtyřbodovém systému. Skóre 1 označuje čistou dojnici, skóre 2 zašpinění z 2 – 10 % vemene, skóre 3 střední míra zašpinění tzn. z 10 – 30 % vemene a skóre 4 označuje silně znečištěné vemeno, více než z 30 % (VOKŘÁLOVÁ, 2007). Podle hygienického skóre můžeme zhodnotit technologii chovu (JEŽKOVÁ, 2017b).

#### **3.4.2.2. Vliv dojení**

Rutina dojení může mít kritický vliv na výskyt mastitid ve stádě dojnic. Infekční formy mastitidy se snadno šíří přes dojící zařízení (JEŽKOVÁ, 2017b). Chyby v hygieně dojícího zařízení mohou roznést infekci po celém stádě (PAZDERA *et al.*, 2005). Hlavním cílem správných postupů při dojení je zabránit šíření mastitidy z jedné krávy na druhé (ELLIS *et al.*, 2007). Správné postupy

zahrnují celou řadu faktorů, od pořadí, v jakém se dojí (pro omezení šíření patogenů z infikovaných krav) až po použití chemických látek a procesů pro dezinfekci struků krávy a udržení dojení bez škodlivých bakterií (JEŽKOVÁ, 2017b).

### **Průběh dojení**

Správné pořadí dojnic při dojení by se mělo orientovat podle toho schématu: zdravé prvotelky -> zdravé krávy -> plemenice v mlezivovém období -> krávy v ochranné lhůtě -> dojnice v ochranné lhůtě -> léčené dojnice (RYSOVÁ, 2017). V každém případě nakažené dojnice chodí na dojírnu jako poslední, abychom se vyvarovali přenosu infekce na ostatní dojnice (ELLIS *et al.*, 2007).

Proces dojení začínáme pečlivou hygienou struků. Ta zahrnuje především použití predippů a vyčkání dostatečné doby působení. Struky se ponořují do roztoku nebo pěny na bázi jodu. Přípravky na bázi jodu rychle ničí patogenní mikroorganismy. Minimální doba působení je 30 sekund (RUEGG *et al.*, 2017; HOGAN *et al.*, 2012). Další možnost vhodného hygienického řešení představuje použití jednorázových utěrek namočených v dezinfekčním roztoku na očištění vemene před dojením (RYSOVÁ, 2017). Správně provedená dezinfekce struků před dojením snižuje riziko nových infekcí způsobených environmentálními patogeny.

Po dezinfekci následuje oddojení prvních stříků mléka (HOGAN *et al.*, 2012). Pro efektivní výsledek musíme z každého struku oddojit 2 až 3 proudy. Při této činnosti by měli dojiči dodržovat hygienické zásady. Doporučuje se nosit nitrilové nebo latexové rukavice pro každou dojnici zvlášť, aby se snížilo šíření patogenů kontaminovanými rukama z nakažené dojnice na zdravou (RUEGG *et al.*, 2017). Cílem odstříků je posouzení kvality mléka a zdravotního stavu dojnice. Dnes již existují speciální NK testy a přístroje, které dokážou ihned určit počet somatických buněk (RYSOVÁ, 2017). NK testy jsou založené na principu změněné konzistence mléka. Do oddojeného vzorku mléka se přilije roztok NK testu. Pokud jsou v mléčné žláze zánětlivé procesy, vzorek zhoustne (SMETANA, 2009).

Na důležitosti nabývá také osoušení struků. Na správně osušených strucích pomocí různých papírových utěrek se vyskytuje méně bakterií. Suchá utěrka se má použít na každou dojnici nová. Použití jedné utěrky pro více vemen je spojeno



s větším měsíčním výskytem klinické mastitidy. Ve stádě, kde používají individuální utěrky, bylo zaznamenáno 7,8 % klinických případů mastitid. V případě stáda, kde se jedna utěrka používala pro více dojnic, se výskyt mastitidy vyšplhal až na 12,3 % (RUEGG *et al.*, 2017).

Dojící zařízení se na struky nasazuje 60 - 90 sekund po prvním kontaktu s vemenem. V dojárnách se dojící zařízení automaticky snímá po dosažení nastaveného minimálního průtoku mléka (JEŽKOVÁ, 2017b). Při strojním dojení je třeba dbát na to, aby nedocházelo k nedodolení nebo k předojování. Celkový čas dojení by neměl přesáhnout 7 minut (SMETANA, 2009). Dále je vhodné zařadit mezidezinfekci dojícího zařízení (strukových násadců) po dojení léčených krav a krav v ochranné lhůtě nebo mastitidní krávy dojit samostatným dojícím zařízením (RYSOVÁ, 2017).

Poruchy a špatné techniky dojení patří k hlavním rizikovým faktorům mastitidy. Kolem 50 % mastitid je způsobeno dojícím zařízením (WESTERLAN *et al.*, 2013). Nestabilní nebo nevhodná pulzace, sklouznutí strukových násadců a nedostatečná hygiena dojícího zařízení přispívají k riziku nákazy tím, že poškozují strukturu struku a patogenním organismům usnadňují průnik (LIŠKA, 2006). Důležitá je pravidelná výměna strukových násadců. Dobře fungující stroj vede k rychlému získávání mléka, aniž by došlo k přetížení struků. Ke klíčovým ukazatelům patří podtlak 35 – 42 kPa v průtokoměru, průměrný průtok mléka 2,3 - 4,1 kg/min a délka fáze stisku 150 – 200 ms. (JEŽKOVÁ, 2017a).

Na závěr dojení se provádí postdipping. Postdipping zabrání šíření patogenních mikroorganismů, které se mohly rozšířit během dojení (HOGAN *et al.*, 2012). Jde o operaci, kdy ponoříme 2/3 struku do dezinfekčního roztoku na bázi chlóru nebo jódu. Účinné ponoření struků do dezinfekce po dojení snižuje riziko nové infekce až o 50 % (VELECHOVSKÁ, 2017). Pro spolehlivý účinek se musí dezinfikovat okamžitě po sejmutí dojícího zařízení, než se svěrač strukového kanálku začne uzavírat a bakterie budou mít možnost kolonizovat a množit se. Kromě zničení patogenů způsobujících mastitidy napomáhá dezinfekce rychlejšímu hojení poškození a poranění struku (JEŽKOVÁ, 2017b). Pro kontrolu aplikace dezinfekce se využívá barevných dezinfekčních roztoků (RUEGG *et al.*, 2017).

### 3.4.2.3. Vliv výživy

Výživa je nejvýznamnější faktor vnějšího prostředí, který determinuje produkci mléka, plodnost, zdravotní stav zvířat a umožňuje realizovat genetický potenciál jedince i celého stáda (ILLEK *et al.*, 2016). K vysoké produkci vyšlechtěný skot se i při malé nevyváženosti krmné dávky stává náchylný k infekci mléčné žlázy (PAZDERA, 2005).

Specifické živiny mají vliv na jednu nebo více imunitních a obranných funkcí. Deficit energie, bílkovin, minerálů a stopových prvků může negativně ovlivnit odolnost vůči mastitidě a hladinu somatických buněk v mléce (CONRAD *et al.*, 1986; ERSKINE *et al.*, 1987; WEISS *et al.*, 1990). Bílkoviny a vápník mají vliv na kontraktilitu hladkého svalstva a uzavírání strukového svěrače. Dále se bílkoviny spolu s vitamínem A a zinkem podílí na kvalitě a množství keratinové zátky ve strukovém kanálku. Bylo prokázáno, že doplněk vitamínu A, betakarotenu a selenu zlepšuje odolnost vůči zánětu mléčných žláz.

Výživa musí dostatečně splňovat potřeby dojnice. V období intenzivního hubnutí dochází k přechodnému zvýšení koncentrace tuku v mléce, následně pak k syndromu nízké tučnosti mléka a syndromu nízké koncentrace bílkovin mléka. Zpravidla se tím zvyšuje počet somatických buněk v mléce a výskyt mastitid (ILLEK *et al.*, 2016). Snižování tuku v mléce může být také zapříčiněno předkládáním krmných dávek s vysokým podílem koncentrátů, zejména šrotů a zrnin, vysokým podílem řepy, cukrovky, pařených nebo silážovaných brambor a melasy (KOUKOLOVÁ, 2017).

Chyby ve výživě mohou nepřímo zvýšit náchylnost krávy k metabolickým poruchám. Bylo prokázáno, že zpomalují uzavírání strukového svěrače. Krávy s mléčnou horečkou mají 8,1 krát větší pravděpodobnost onemocnění mastitidou a 9 krát větší pravděpodobnost koliformní mastitidy. Mastitidy jsou také spojeny s ketózou a zadrženu placentou (JEŽKOVÁ, 2017b).

### 3.4.2.4. Vliv jedince

Další biosystém představuje vlastní zvíře. Jeho imunitní výbava, morfologické a fyziologické vlastnosti mohou působit jako predispoziční faktory

(ŠTOSSOVÁ, 2016). Neměla by se pominout možnost, že odolnost proti mastitidě skotu lze ovlivnit i po stránce genetické, šlechtěním (ZAVADILOVÁ, 2017).

### **Imunita a obrana mléčné žlázy**

Náchylnost k mastitidám výrazně ovlivňuje stav imunitního systému jedince. Pokud dojde k narušení imunitního systému, zvyšuje se pravděpodobnost výskytu infekce. Mléčná žláza skotu tvoří bariéry významné pro imunitu a obranu proti mastitidním patogenům. Mezi tyto bariéry patří kůže struku, strukový svěrač a strukový kanálek (SEYDLOVÁ, 2011). Kůže struku obsahuje mastné kyseliny, které brání množení bakterií. Tyto mastné kyseliny s častým mytím ubývají. Správné je zachovat kůži nepoškozenou a případné zranění důsledně dezinfikovat (JEŽKOVÁ, 2017a).

Další obrannou linii zajišťuje strukový svěrač a strukový kanálek uzavřený keratinem. Během stání na sucho se keratin hromadí ve strukovém kanálku a vytváří zátku. Keratin je utvářen buňkami na vnitřní straně kanálku a brání vstupu infekce (SEYDLOVÁ, 2011). Pokud se strukový kanálek z nějakého důvodu poškodil, zvyšuje se pravděpodobnost infekce mléčné žlázy. U relativně vysokého procenta krav keratin vzniká pomalu. Za vhodné se z tohoto důvodu považuje používat sealy (vnitřní a vnější strukové zátky), aby se zabránilo průniku do mléčné žlázy.

Výsledek infekce závisí na účinnosti interakce bílých krvinek a invazi bakterií (JEŽKOVÁ, 2017b). Bílé krvinky procházejí do mléčné žlázy a mléka z krve. Signalizují, že mléčnou žlázu zasáhly patogenní mikroorganismy. O zasažení mléčné žlázy mluvíme v případě, že individuální počet buněčných elementů stoupne nad 300 000/ml. Cílem organismu je pomocí bílých krvinek eliminovat přítomnou infekci, poškozené buňky mléčné žlázy a zajistit tak rychlé uzdravení (ZELINKOVÁ, 2017). Na kvalitu leukocytů mají negativní vliv stres a negativní energetická bilance (JEŽKOVÁ, 2017b). Při dlouhodobém působení stresu na dojnici dochází ke snížené odolnosti vůči infekci (ŠTOSSOVÁ, 2017). Negativní energetické bilance docílíme nevyváženou výživou vůči energetickému výdeji. Běžně tomu tak je v období po otelení. Krávy s negativní energetickou bilancí mají větší riziko mastitid (ROCHE *et al.*, 2006).

### **Imunita u prvotetek**

Obzvláště náchylnými ke vzniku mastitid jsou prvotelky. Vyznačují se nižší obranyschopností, a tedy vyšší vnímavostí k patogenům. Během první laktace dokončují tělesný růst a rovněž dochází k rozvoji produkčního epitelu mléčné žlázy. V této době se netvoří keratinová zátka ve strukovém kanálku vůbec nebo jen omezeně. Udává se, že 77 % mastitid u prvotetek se objeví již před otelením a způsobují ji nejčastěji stafylokoky (JEŽKOVÁ, 2017a).

#### **3.4.2.5. Vliv vlastního genetického založení jedince**

Vlastní genetické založení jedince souvisí s náchylností vůči mastitidě (WOLFOVÁ, 2001). Představuje jednotlivé vlohy pro určité znaky a jejich zapsání v genetické informaci, ty se pak mohou předávat z generace na generaci. Soubor znaků v rámci jednoho organismu se nazývá fenotyp. Dědičnost jednotlivých znaků zprostředkovávají geny a jejich konkrétní formy - alely. Některé mohou být pozorovatelné, některé jsou zjistitelné pouze za pomoci speciálních vyšetření. Existuje několik různých typů dědičnosti, z nichž některé jsou dokonce vázány na pohlaví. Pochopení základních zákonů dědičnosti je klíčové pro pochopení celé problematiky genetické predispozice (ŠÍPEK, 2014).

### **Princip dědičnosti**

Dědičnost je založena na existenci dvou nukleových kyselin (VARGOVÁ, 2017). Rozlišujeme dva druhy nukleových kyselin: deoxyribonukleovou kyselinu – DNA a ribonukleovou kyselinu - RNA. Základní stavební jednotkou nukleových kyselin je nukleotid. Skládá se z cukru pentózy, dusíkaté zásady (báze) a z kyseliny fosforečné. Dusíkaté báze jsou adenin (A), thymin (T), cytosin (C), guanin (G) a uracil (U). Jednotlivé nukleotidy obsahující různé dusíkaté báze, mohou být v řetězci nukleové kyseliny seřazeny různým způsobem (DIETSCHÉ *et al.*, 2017). Podle zákona komplementarity se báze pojí A s T a C s U vodíkovými můstky (ŠÍPEK, 2014).

Jako základní funkční jednotku dědičnosti označujeme gen (VARGOVÁ, 2017). Geny můžeme rozdělit podle jejich účinnosti při realizaci dědičného znaku na

monogenní a polygenní. Na tvorbě znaku se podílí málo monogenních genů. Jde o geny velkého účinku. Polygenních genů se podílí velké množství při tvorbě znaku. Jde o znaky malého účinku (ŠÍPEK, 2014).

Geny se vyskytují na chromozomech za sebou. Chromozomy lze nalézt v jádře buněk mnohobuněčných organismů. Skot má zpravidla 60 chromozomů. Každý gen má své unikátní místo na určitém chromozomu a na jeho určité části (VARGOVÁ, 2017). Toto místo označujeme jako genový lokus (ŠÍPEK, 2014).

### **Přenos a realizace DNA**

Přenos a realizace genetické informace představuje tzv. centrální dogma. Realizaci znaku zachycuje tento zjednodušený postup: DNA – transkripce – mRNA – translace – protein – uplatnění proteinu – znak (ŠÍPEK, 2014).

Základem přenosu a ukládání genetické informace jsou procesy replikace, transkripce a translace. Proces začíná replikací, kdy z 1 molekuly DNA vznikají 2 identické molekuly DNA. Dvoušroubovice se rozplete, báze se přetrhají a vzniknou 2 shodná ramena DNA (DIETSCHÉ *et al.*, 2017). Následuje transkripce. Transkripce dochází k přenosu genetické informace z jádra buňky, tzv. přepisuje se do mRNA. Poslední krok přenosu DNA zastává translace, překlad genetické informace z pořadí nukleotidů mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Překládá se do molekuly bílkoviny. Translace probíhá v cytoplazmě za přítomnosti mRNA, ribozomů, aktivované tRNA a řady enzymů (MACHÁČEK, 2012).

### **Genomová selekce**

Genomová selekce probíhá u dojnic i býků mléčných plemen (DE HASS *et al.*, 2002). Dědivost náchylnosti vůči mastitidě představuje korelaci 0,1 (WOLFOVÁ, 2001), je tedy velmi nízká (DE HAAS *et al.*, 2002). Přesto byla začleněna do chovatelských cílů mléčného odvětví na celém světě. Nízká dědičnost značí, že vlastnost je z velké části ovlivňuje prostředí (ZAVADILOVÁ, 2017). Rozdíly v odhadech chovatelských hodnot závisí na vlivu prostředí (HAYES *et al.* 2009). Znalost genů přímo a nepřímo kódujících zdraví vemene, zejména

u klinických mastitid, je omezená. Velké fenotypové databáze, které zahrnují patogenní identifikaci klinických a subklinických případů mastitidy, potřebujeme k vyhodnocení sdružování genů a genetických markerů se zdravím vemene. Markerem rozumíme gen přesně známé lokalizace (ŠÍPEK, 2014).

Existují znaky, které geneticky souvisí s výskytem mastitid. Nejvíce souvisí s náchylností vůči mastitidě počet somatických buněk. Po nich následují vlastnosti jako dlouhověkost, počet případů klinické mastitidy za laktaci, jednotlivé úseky laktace, užitkovost a exteriérové znaky (ZAVADILOVÁ, 2017; WOLFOVÁ, 2001). Nejnižší koeficienty dědivosti v souvislosti se záněty vemene vykazují reprodukční ukazatele, jako inseminační interval či mezibřezost (ZAVADILOVÁ, 2017).

Jelikož mastitida je komplexní onemocnění, ukazuje se, že zde neexistuje jeden gen, který by identifikoval genetické rozdíly, co se týče odolnosti nebo tolerance vůči mastitidám. Je vysoce pravděpodobné, že geny malého účinku se podílejí na genetických rozdílech. Používání genomických strategií pomůže určit tyto minorgeny pro zpřesnění odhadu. Pro využití genetické selekce na odolnost či toleranci vůči mastitidám potřebují vědci najít efektivní fenotypové ukazatele a mít přístup k přesnějším záznamům o mastitidách. Selektce na odolnost či toleranci vůči mastitidám nám poskytuje přirozený výběr odolnějších zvířat, schopných produkovat kvalitnější mléko. Pochopením sledu těchto vzájemných interakcí můžeme mnohem lépe rozvíjet nové strategie pro ochranu krav, které jsou více náchylné k infekcím (PIGHETTI, 2014).

#### Somatické buňky v mléce

Nejčastějším nepřímým selekčním kritériem bývá počet somatických buněk (PSB). Somatické buňky (SCC) se skládají především z buněk imunitního systému, které vstupují do vemene. Jejich funkce spočívá v ochraně vemena před infekcí. Starší dojnice mívají zpravidla v mléce vyšší počet somatických buněk, stejně jako dojnice po otelení a na konci laktac (MADOUASSE *et al.*, 2010). Dědivost znaku PSB vykazuje vyšší pravděpodobnost výskytu než dědivost znaku klinické mastitidy. Účinnost nepřímé selekce však závisí především na korelaci mezi oběma znaky (WOLFOVÁ, 2001). Současné vědecké studie se zaměřují na pět slibných ukazatelů: obsah somatických buněk v mléce do 150 dní po otelení, obsah somatických buněk

v mléce od 150 do 400 dní po otelení, absence nebo výskyt počtu somatických buněk nad 150 000/ml v jakékoliv fázi laktace, četnost výskytu počtu somatických buněk nad 150 000/ml v měsíčních testech a počet somatických buněk v mléce při výskytu environmentálních a kontagiózních mastitid (SATTLER *et al.*, 2014). Průměrná genetická korelace mezi klinickou mastitidou a počtem somatických buněk v literatuře udává zhruba 0,7; tedy vysokou pravděpodobnost (WOLFOVÁ, 2001). Mastitidy vzniklé v časně fázi laktace vykazují korelaci se somatickými buňkami 0,78. Celkově vzniklé mastitidy za laktaci v závislosti na somatických buňkách mají korelaci 0,82. Pokud somatické buňky dosahují nad 500 000/ml, vykazují korelaci s mastitidami 0,92 (BUCEK, 2011). Výzkumy nadále potvrdily, že vztah mezi počtem somatických buněk a odolností k mastitidě není lineární. Stáda s počtem somatických buněk menším než 150 000 vykazovaly vyšší výskyt klinických mastitid než stáda s počtem somatických buněk větším než 250 000 (v jiné studii s větším než 700 000). To indikuje, že existuje optimální počet somatických buněk a pokles pod tuto hranici signalizuje nedostatečnou schopnost krávy vyrovnat se s infekcí bakterií způsobujících záněty vemene. Velmi nízký počet somatických buněk nemusí znamenat tedy optimálně zdravé vemeno (WOLFOVÁ, 2001). Zlepšení využití běžně sbíraných dat o obsahu somatických buněk v mléce bude poskytovat více fenotypově specifických vlastností a bude tak napomáhat identifikaci genetických markerů, které ovlivňují tyto vlastnosti (PIGHETTI, 2014).

### Dlouhověkost

Dlouhověkost řadíme mezi znaky, které souvisí s mastitidami. Lze obecně říci, že klinická mastitida má záporný genetický vztah s funkční i skutečnou dlouhověkostí. Čím bude dojnice více predisponována ke kratší délce produkčního života, tím je geneticky náchylnější k mastitidě (ZAVADILOVÁ, 2017). Koeficient dědivosti je 0,049 – 0,094. Nízká dědičnost udává, že je znak z velké části ovlivňován prostředím. Dlouhověkost je komplex mnoha vlastností, které od sebe lze těžko odlišit (BRZÁKOVÁ, 2017).

### Fáze laktace

Většina průzkumů mastitidy ukazuje, že 2/3 všech případů klinické mastitidy se vyskytují na počátku laktace (JONES *et al.*, 1989). Pokud dojnice trpí mastitidou na počátku laktace, je více ovlivněna její mléčná užitkovost i zdravotní stav, než když se objeví na konci laktace. V druhé části laktace dochází k vyřazování z chovu spíše na základě zdravotního stavu než kvůli snížení mléčné produkce (ZAVADILOVÁ, 2017).

Existuje mnoho případů, kdy dojnice onemocní v době stání na sucho. Mohou se projevit nové klinické mastitidy, nebo mohou zůstat jako chronické, které se klinicky projeví v rané fázi laktace. Řízení chovu, zvláště s ohledem na podmínky prostředí v době stání na sucho, může mít potenciálně hluboké účinky na výskyt mastitidy při laktaci (BRADLEY *et al.*, 2000).

### Exteriérové znaky

Dalšími nepřímými selekčními kritérii využitelnými pro šlechtění na rezistenci mastitidy mohou být některé exteriérové znaky. Podle studií byly nejvyšší genetické korelace k výskytu mastitidy zjištěny u znaků přední upnutí vemene, hloubka vemene a mléčný charakter. Čím vyšší je bodové hodnocení pro přední upnutí a hloubku vemene, tím menší je počet případů klinické mastitidy v 1. laktaci. Čím vyšší ocenění mléčného charakteru dojnice dosahuje, tím vyšší je výskyt mastitid. Znaky exteriéru se vyznačují vyšší dědivostí než náchylnost k mastitidě nebo počet somatických buněk (KULOVANÁ, 2001).

### Užitkovost

Mezi doživostí a náchylností k mastitidě existuje kladná genetická korelace. Jednostranná selekce na vysokou mléčnou užitkovost tedy zvyšuje náchylnost krav k mastitidě (KULOVANÁ, 2001; RAJALA, 1998). Podle simulačních studií je při korelaci mezi doživostí a výskytem mastitidy 0,3 nutno očekávat, že v běžných selekčních programech nezahrnujících zdravotní stav zvířat dojde k nárůstu výskytu mastitidy o 0,02 případy na krávu a rok (KULOVANÁ, 2001). Studie také prokázaly, že čím vyšší užitkovosti dojnice dosahuje, tím má větší problém



s uzavíráním strukového kanálku, který je vstupní branou infekce (SEYDLOVÁ, 2011). Rozdíl v užitkovosti mezi infikovanými a neinfikovanými mléčnými žlázami dosahuje až dva kilogramy mléka denně (JEŽKOVÁ, 2017a).

### 3.5. Lokusy spojené s náchylností k mastitidě

Existuje značné množství genetických výzkumů týkající se laktace a zdraví vemene. Genetické znalosti vedly ke značnému zlepšení výnosu mléka, avšak pokrok v technologických vlastnostech mléka a zdraví vemene je poměrně pomalý (SHOOK, 2006). Uvádí se, že lokální lokusy pro somatické buňky (SCC) souvisí s odolností vůči mastitidě u dojnic (SILVERI *et al.*, 2006). Lokusem nazýváme místo v chromozomu, kde se daný gen nachází (ŠÍPEK, 2014). Lze tedy říci, že gen nacházející se na daném místě souvisí s odolností vůči mastitidě (SHOOK, 2006). Navíc vědci zjistili, že tzv. mikroRNA (miRNA), by mohla významně ovlivnit vývoj mléčné žlázy skotu, produkci mléka a rezistenci nebo náchylnost k mastitidě (SILVERI *et al.*, 2006).

Nedávný vývoj molekulární biologie otevřel možnost využití zvířecích modelů pro srovnávací studie (SHOOK, 2006). Cílené přerušení genu u myši (experimenty s vyřazováním genů) odhalilo několik fenotypů souvisejících s mléčnou žlázou. Fenotypem označujeme vnější projev daného genetického uspořádání na jedinci. Uvolnění sekvence genomu skotu umožnilo objevování nových markerů a vytvoření syntetických map (RON *et al.*, 2007). Do těchto map se doplňují nové objevy. Možnost vyhledávání v databázi pomocí termínů zvířecích vlastností k výběru cílů otevírá možnost zavedení komplexních strategií (GRISART *et al.*, 2002).

Klasické přístupy pro genetiku zaměřené na jeden genový efekt úspěšně identifikovaly omezený počet genů. Identifikace klíčových genů souvisejících se složitými znaky vyžaduje komplexní přístup založený na vzájemném působení genů na sobě (SCHADT, 2006). Na vývoji, rezistenci nebo náchylnosti mléčné žlázy k mastitidě se podílejí kandidátské markery těchto typů: lokusy pro kvantitativní

znaky (QTL), jednonukleotidové polymorfismy (single nukleotid polymorphism, SNP), AFLP markery a miRNA. Tyto markery představují 934 lokusů. Předpokládané kandidátské lokusy související s mléčnou žlázou se vyskytují na všech chromozomech s výjimkou chromozomu Y. Nejvyšší počet kandidátských lokusů se nachází na chromozomech 6, 14 a 19 a nejnižší na chromozomech 28, 24 (OGOREVC *et al.*, 2009).

### 3.5.1. Geny miRNA

Geny miRNA se mohou podílet na vyjádření genů v mléčné žláze skotu. V současné době víme o 32 genech miRNA. Vyskytují se a překrývají v oblastech s QTL pro vlastnosti mléka a mastitidy. Prokázalo se, že několik genů reguluje miRNA, ale ne v mléčné žláze (GU *et al.*, 2007).

### 3.5.2. Jednonukleotidové polymorfismy (SNP)

Výzkumy potvrdily, že existuje spojitost mezi variacemi DNA a fenotypem mléčné žlázy u 24 kandidátních SNP (GRISART *et al.*, 2002; COHEN-ZINDER *et al.*, 2005; RON *et al.*, 2007). Několik genů ovlivňuje fenotyp mléčné žlázy a některé přímo souvisí s rezistencí vůči mastitidě (RUPP *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007; LEYVA-BACA *et al.*, 2007). S fenotypem mléčné žlázy souvisí 11 genů a s rezistencí nebo náchylností k mastitidě 3 geny. Tyto geny jsou označeny jako *IL8RA*, *TLR4* a *BoLA-DRB3* (OGOREVC *et al.*, 2009).

#### 3.5.2.1. CD14

V další studii skupina vědců testovala mutaci v genu CD14 a její souvislost s mastitidou. Celkem se testovalo 94 kusů skotu v Indii. Kombinovaly se 2 lokusy, ze kterých lze maximálně určit 9 genotypů. Došlo se k závěru, že dojnice s genotypovou kombinací *ABDD* značí vyšší náchylnost vůči mastitidě. Dojnice s kombinací alel *AACD* se projeví jako nejvíce odolné (SELVAN *et al.*, 2016).

### 3.5.3. Lokusy pro kvantitativní znaky(QTL)

Existuje 344 QTL spojených s vlastnostmi mléka u dojnic a 71 QTL s vlastnostmi týkajícími se mastitid. QTL geny se nachází na všech chromozomech, kromě chromozomů BTA16, BTA24 a BTAX. Důvodem, proč se QTL pro mléko a mastitidu vyskytují na tak velkém množství chromozomů, mohou být genetické faktory a vnější prostředí. Tyto faktory přispívají k fenotypu zvířat a k vzájemnému působení mezi hostitelem a patogenem. Nejvyšší hustota QTL spojená s mléčnými vlastnostmi byla zjištěna na BTA6 a BTA14 a nejvyšší zjištěná hustota QTL související s mastitidou na BTA3 a BTA14 (OGOREVC *et al.*, 2009). V jiné studii byl zmíněn lokus QTL na chromozomu BTA9 v souvislosti s množstvím stanovení, zda jedinec bude odolný vůči mastitidě (SANDO *et al.*, 2007).

### 3.5.4. AFLP markery

K mapování QTL lze použít i AFLP markery. Tyto markery se s genotypem QTL sdružují. U AFLP markerů bylo rovněž uvažováno o jejich potencionálním vztahu s mastitidou. Prokázalo se 27 AFLP markerů souvisejících s výskytem klinické mastitidy. Nejslibnější marker nazývaný se CGIL4. Byl charakterizován a mapován na chromozomu BTA22 q24 (SHARMA *et al.*, 2006).

#### 3.5.4.1. CGIL4

První známka o výskytu CGIL4 byla při studii genu Lf, který se spojoval s vyjádřením genetického programu vedoucího k antibakteriálním účinkům během zánětu (SANCHEZ *et al.*, 1992; SEYFERT *et al.*, 1994). Kvůli nedostatku údajů o mastitidách se zveřejnilo jen několik QTL analýz tohoto znaku. V těchto studiích se prokázalo, že málo chromozomů spojených s mastitidou nese QTL, včetně BTA3, 6, 14, 27 (KLUNGLAND *et al.*, 2001) a BTA14 a 18 (SCHULMAN *et al.*, 2004).

V roce 2006 proběhla studie lokalizací markerů spojených s výskytem mastitid. Celkem se testovalo 200 genomů dojnic. Analýza odhalila 27 významných AFLP markerů v rezistentní skupině. Nejslibnější marker byl potom vybrán pro další charakterizaci. Analýza sekvence detekovala polymorfismus (A <-> G), který zodpovídal za polymorfismus AFLP. Tento polymorfismus se označil jako CGIL4.

PCR-RFLP analýza ukázala, že frekvence alely *A* byla výrazně vyšší v rezistentní skupině. Další logistické analýzy prokázaly že *CGIL4* významně souvisí s počtem somatických buněk v mléce a s výskytem mastitid. Radiační hybridní mapování přiřadilo daný marker na 22. boviní chromozom (BTA22) (SHARMA *et al.*, 2006).

Vyhodnocení markeru AFLP *CGIL4* vykazovalo znaky spojené s mastitidami. Účinky QTL s markerem *CGIL4* významně prokázaly vliv na počet somatických buněk a výskyt mastitidy v první a druhé laktaci. To značí, že některé genové varianty ovlivňují jak PSB, tak mastitidy. Uvedené QTL také ovlivňuje výtěžnost mléka, což udává nepříznivou korelaci mezi oběma znaky (HARMON, 1994). Většina dojnic byla v lokusu *CGIL4* heterozygotní, a to v 61 % případech. Dojnice s genotypy *GG* měly vysokou hladinu PSB, vysokou pravděpodobnost výskytu mastitid a výtěžnost mléka v první laktaci (WILTON *et al.*, 1972). Také bylo zjištěno, že celkový obsah bílkovin může mít vliv na malé změny u krav s mastitidou (HARMON, 1994).

Další studie tohoto lokusu proběhla v roce 2011. Provedla se genotypizace 104 kusů holštýnského skotu a 110 kusů simentálského skotu. Pro detekci polymorfismu byla použita metoda PCR / RFLP. Sekvence primerů byly následující: *E155F* (Forward) 5'-CGC AGA CAA TGA AGT ATC TAA AAC-3' a *E155R* (Reverse) 5'-GAG GAG GTG GGT GCC TCA GA-3'. Přítomnost 399-bp PCR fragmentu se detekovala elektroforézou na 3,5% agarózovém gelu. PCR fragment byl následně omezen za použití restriční endonukleázy *TaqI*. Dosavadní alela *CGIL4* (*A*) se detekovala jako dva fragmenty, jedna v délce 125 bp a druhá 274 bp. Pro alelu *CGIL4* (*G*) byly nalezeny tři fragmenty v délce 39 bp, 125 bp a 235 bp. Hodnoty počtu somatických buněk mezi genotypy se testovaly analýzou odchylky (ANOVA).

Frekvence alel *CGIL4* (*A*) a *CGIL4* (*G*) se významně nelišila, což je v rozporu s výsledky Sharma (2006). Sharmova studie vyvodila vyšší frekvenci alel *CGIL4* (*A*) v rezistentní skupině. Konečnou hypotézou bylo, že simentálský skotbude odolnější vůči mastitidě, vzhledem k vícestrannému využití. Nicméně frekvence alely *CGIL4* (*A*) v této skupině byla mírně nižší než frekvence alely *CGIL4* (*G*). Pozorované a teoretické genotypové frekvence nebyly v Hardy-Weinbergově rovnováze a frekvence byly odchylovány ve prospěch heterozygotů.

Chovné hodnoty PSB v mléce pro genotypy a alely CGIL4 nevykazovaly žádný významný rozdíl, a proto lokus neměl v této analýze vliv na chovatelskou hodnotu somatických buněk (ČÍTEK *et al.*, 2011).

### **3.6. Specifické léčení a zaprahování**

Léčba mastitidy vyžaduje okamžitý individuální léčebný zásah s cílem vyléčit konkrétní dojnici. Naproti tomu řešení problematiky mastitid v rámci stáda vyžaduje promyšlenou, dlouhodobou, ekonomicky rentabilní strategii, která má za cíl ozdravení celého stáda a jeho návrat k plnohodnotné produkci. (ZELINKOVÁ, 2017).

Účinný způsob, jak ošetřovat a léčit dojnice s mastitidami na farmě, je sestavit plán s veterinárním lékařem na základě laboratorních výsledků, pro zjištění přítomných bakterií (JEŽKOVÁ, 2017b). Odebíráním vzorků mléka a následnou kultivací, lze určit patogen způsobující zánět vemene a následně zahájit cílenou léčbu. Vzorky mléka se odebírají z každé nakažené čtvrtě zvlášť. Mléko se aplikuje pomocí sterilní kličky na agar a po 22 hodinách při teplotě 32 °C je znám výsledek (VĚŘÍŠ, 2017).

Období zaprahování můžeme využít jako vhodnou dobou, kdy se krávy s mastitidami dají dobře léčit. Zaprahovat se dá plošně antibiotiky, kdy dojde k přeléčení subklinických případů. Lze zaprahovat i bez antibiotik a léčit jen dojnice s mastitidou nebo s vysokým obsahem somatických buněk v posledních měsících laktace (JEŽKOVÁ, 2017b).

### **3.7. Preventivní opatření**

Bylo zjištěno, že v některých stádech má až 60 % jalovic ve vemeni původce mastitid již před otelením. Přibližně 16 % z nich prodělá během první laktace klinickou mastitidu a 30 % z těchto případů probíhá prvních 14 dnů po otelení. Bakterie jsou stejné, jako ty co napadají dojnice. Přenos se uskutečňuje ocucáváním

telat nebo hmyzem. Vhodné je zvolit technologii chovu, aby nedocházelo k ocucávání nebo vyřazovat „cucalky“ z chovu. Rovněž hmyz může poranit kůži struků a infekce má větší šanci vzniknout, než u kůže nepoškozené. Hubení hmyzu by mělo probíhat pravidelně.

Stejně důležitá je i doba telení. Se zvyšujícím se věkem při prvním telení se zvyšuje i riziko vzniku klinické mastitidy po porodu. U jalovic otelených v létě bývá vyšší výskyt mastitid než u jalovic otelených od podzimu do jara. Prevencí proti vzniku mastitidy můžeme podpořit přidáním vitamínu E a selenu, které omezují její vznik (LIŠKA, 2006).

### **3.7.1. Vakcinace proti mastitidě**

V dnešní době již existují očkovací vakcíny proti mastitidě. Lze konstatovat, že vakcinace zaměřené na zvýšení odolnosti proti vzniku mastitid u dojnic byly dosud neúspěšné, zejména ve snižování výskytu nových infekcí mléčné žlázy. Zaznamenávala se však zlepšení ve spontánním vyléčení a ve snížení intenzity klinických projevů onemocnění. Dokonalé ochrany před infekcemi patogeny mléčné žlázy nebylo dosud vakcinací dosaženo (RYŠÁNEK, 2010). Důraz by se měl klást především na faktory řízení chovu, než využívat rutinně vakcíny. Mohou se však použít jako součást strategie snižování nákazy v chovu (WHITAKER *et al.*, 2004).

## **3.8. Ztráty způsobené mastitidami**

Chronická mastitida je schopna zničit celou mléčnou žlázu a tím vést k vyřazení dojnice z chovu. Subklinická mastitida také může za snížení produkce mléka (VELECHOVSKÁ, 2017). Ztráty na produkci mléka při 200 - 300 000 SB/ml se odhadují 6 - 7% (LIŠKA, 2006). Každá dojnice na třetí laktaci se 400 000 SB/ml vyprodukuje o 274 kg mléka méně, což znamená přibližně o 2055 Kč nižší tržby. Na 100 krav s tímto počtem somatických buněk se sníží tržby o 205 500 Kč. Náklady na klinickou mastitidu často podceňujeme, často vidíme jen zjevné náklady – léky, vylité mléko, a práci navíc. Skutečné náklady na klinickou mastitidu zahrnují náklady na diagnózu, léčiva, práci, vylité mléko a ztrátu jeho produkce. Skutečné

ztráty způsobené klinickým případem léčeným 5 dnů mohou dosahovat i 6000 Kč na 1 kus. V případě v chovu s 1000 ks krav se jedná o částku blízkou 4 000 000 Kč.

Subklinickou mastitidou trpí asi 20 - 35% krav a každou laktaci onemocní 25 – 45 % plemenic (VELECHOVSKÁ, 2017). Záněty vemene zhoršují produkci, reprodukci, hodnotu mléka pro zpracovatele, konečnou kvalitu výrobků i prodejnost mléka, zvyšuje se riziko neplodnosti a zabřezávání se může snížit i o 40 % (JEŽKOVÁ, 2017a).

V posledních letech se snížil počet subklinických případů, ale na druhou stranu vzrostl počet klinických případů. Tyto změny značí výsledek zlepšených postupů dojení, vyřazování chronicky nemocných krav a je také důsledkem intenzivnější výroby mléka.

Do kvality mléka je nutné investovat finanční prostředky. Konkrétně se jedná o měření počtu SB, školení dojičů, čištění boxů, ošetření zaprahovaných krav, atd. Investice do kvality mléka zvyšují ziskovost farmy a zlepšují životaschopnost celého odvětví (VELECHOVSKÁ, 2017).

### **3.9. Použité metody**

Pro molekulárně genetické analýzy se využívá celá řada metod. K těm základním, které jsou přítomny i v této práci, patří izolace DNA, polymerázová řetězová reakce, polymorfismus délky restrikčních fragmentů a elektroforéza.

#### **3.9.1. Izolace DNA**

K práci zaměřené na analýzu genomu je nutné mít dostatečné množství izolované DNA. Požadovaný stupeň čistoty a kvalita izolované DNA pak závisí na metodě, která se zvolila k dalším analýzám. Pokud zahrnuje polymerázovou řetězovou reakci (PCR), nesmí izolát obsahovat kontaminanty, které ovlivňují některou ze složek PCR reakce.

V současné době existuje celá řada metod pro izolaci DNA. Jednou z nejvyužívanějších je metoda izolace DNA za pomoci komerčně dostupných kitů. Tyto kity pracují na obecně známých principech. Ve většině případů se jedná o izolaci DNA, založenou na magnetickém zachycení DNA, případně na zachycení molekul DNA na membránách. Postupy se liší v závislosti na konkrétních použitých kitech. Jednotlivé složky výrobce dodává již ve formě hotových roztoků. Součástí kitů jsou i potřebné plastové kolony pro vstupní vzorky, jednorázové pipety a kolony pro uchycení výsledné DNA.

Obecné schéma izolace DNA zahrnuje několik základních kroků. Začíná narušením buněk, z nichž je DNA izolována. Následuje odstranění kontaminujících látek. Jsou to především proteiny, RNA, polysacharidy a polyfenoly. Na závěr se oddělí DNA od roztoku srážením alkoholem (FRYDRYCHOVÁ *et al.*, 2018).

### 3.9.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda snadného zmnožení úseku DNA. Zmnožený úsek se ohraničuje na obou svých stranách tzv. primery. Primery jsou obvykle 20 – 25 nt dlouhé, v daném páru musí mít srovnatelný počet CG:AT párů. Využíváme 2 primery, forward primer a reverse primer. Sekvence forward primeru je totožná se sekvencí horního vlákna. Reverse primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle horního vlákna. K zmnožení nového úseku DNA se používá termostabilní DNA polymeráza, nejčastěji bakterie *Thermus aquaticus*. Podle názvu bakterie se označuje jako *Taq* polymeráza.

PCR probíhá v zařízení zvané termocykler. Toto zařízení dokáže během několika málo sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia (PAPOUŠEK, 2013).

PCR reakce se skládá ze třech základních kroků. Prvním krokem je denaturace, při níž se DNA zahřívá po dobu 20 - 30 sekund na teplotu 94 – 98 °C. Dochází k narušení vodíkových můstků a k rozpletení vláken DNA. Vzniká tak jednovláknová DNA. Poté se teplota sníží na 50 – 65 °C, což umožní nasednutí primerů na specifická místa DNA. Teplota se odvíjí od délky a počtu CG párů. Čím větší délka a počet CG párů, tím je teplota vyšší. Nakonec se teplota opět zvýší



na 72 – 80 °C. V tomto kroku dochází již k samotné syntéze DNA (FRYDRYCHOVÁ, *et al.*, 2018).

### **3.9.3. Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)**

Při RFLP reakci dochází ke štěpení DNA pomocí enzymů tzv. nukleáz. Nejvíce se uplatňují restriční endonukleázy. Restriční endonukleázy rozpoznávají v molekule DNA krátké specifické sekvence a v místě této sekvence molekulu štěpí. Štěpení restričními endonukleázami dovoluje při určitých podmínkách a při přítomnosti enzymu tzv. DNA ligázy, rozštěpené molekuly zase spojit dohromady. Snížením teploty dochází ke spojení vodíkových můstků a pomocí enzymu ligázy k obnovení fosfodiesterové vazby mezi řetězci (FRYDRYCHOVÁ *et al.* 2018, PAPOUŠEK, 2016).

### **3.9.4. Kontrola izolovaného DNA - elektroforéza**

Abychom zviditelnili výsledek jakéhokoli pokusu nebo práce s DNA, musíme danou DNA zviditelnit. To je možné právě za pomoci elektroforézy.

Nukleové kyseliny jsou záporně nabitě molekuly, díky fosfátové spojení mezi jednotlivými nukleotidy. V elektrickém poli stejnosměrnému proudu se pohybují od anody ke katodě. Pro práci s DNA při PCR a RFLP se nejčastěji využívá agarózová elektroforéza. Tento typ elektroforézy probíhá v agarózovém gelu ponořeném do TBE pufru, díky tomu je možné rozdělit molekuly podle velikosti. Výsledek se vizualizuje pod UV světlem (FRYDRYCHOVÁ *et al.*, 2018).

## 4. Materiál a metodika

K analýze bylo použito 50 vzorků mléka dojníc. Vzorky se odebíraly na farmě v Litochovicích Zemědělského obchodního družstva Předslavice v srpnu 2017. Odběr vzorků proběhl během dojení, před nasazením dojícího zařízení. Mléko se ze struku odstříkávalo ručně do zkumavek, které se pečlivě označily. Vzorky mléka se následně uskladnily v mrazících boxech a postupně se využívaly se k analýze.

Dojnice, od kterých se odebíral vzorek mléka, byly vybírány náhodně. Skupina vybraných dojníc se skládala ze dvou plemen – Holštýnský skot a Český strakatý skot. Lišily se od sebe stářím i pořadím laktace, ve kterém se nacházely. Přehled zvolených dojníc je promítnut v tabulkách č.3 a č.4.

Číslo dojnice	Plemeno	Pořadí laktace	Datum narození
568 114	H100	1	13.4.2012
494 137	H100	3	7.7.2012
337 196	H100	6	4.3.2010
451 287	H100	5	25.6.2011
337 148	H100	7	9.1.2009
494 164	H100	1	10.10.2015
451 403	H100	4	15.2.2012
413 059	H100	3	13.11.2010
537 484	H100	2	13.10.2013
494 154	H100	1	6.8.2012
494 166	H100	4	30.8.2012
568 198	H100	2	9.7.2014
494 316	H100	1	22.12.2015
568 218	H100	1	26.7.2014
568 134	H100	2	24.3.2014
412 956	H100	5	15.5.2010
568 112	H100	2	30.3.2014
537 448	H100	3	7.8.2015
568 297	H100	2	2.12.2014

Tab.č.3 – Přehled použitých dojníc k analýze plemene holštýnský skot (H100)

<b>Číslo dojnice</b>	<b>Plemeno</b>	<b>Pořadí laktace</b>	<b>Datum narození</b>
494 194	C100	2	30.10.2012
568 310	C100	1	25.11.2014
568 290	C100	1	20.11.2014
451 354	C100	3	6.12.2011
568 232	C100	2	24.8.2014
393 778	C100	6	13.12.2011
494 130	C100	4	20.6.2012
451 278	C100	5	25.6.2011
565 186	C100	1	29.6.2014
393 799	C100	1	31.12.2014
568 259	C100	2	21.9.2014
568 228	C100	1	18.8.2014
413 051	C100	6	28.10.2010
494 302	C100	10	3.9.2005
197 096	C100	9	1.8.2005
568 212	C100	2	22.7.2014
413 085	C100	6	30.12.2010
239 167	C100	8	18.8.2006
494 161	C100	4	17.8.2012
494 269	C100	2	14.2.2013
568 258	C100	2	21.9.2014
451 206	C100	6	15.3.2011
499 306	C100	3	16.4.2013
451 286	C100	5	10.8.2011
413 083	C100	1	4.12.2015
413 149	C100	4	6.3.2011
568 260	C100	1	22.9.2014
537 542	C100	1	8.5.2015
393 794	C100	6	6.2.2010
537 563	C100	2	1.3.2014
568316	C100	1	1.1.2015

**Tab.č.4-Přehled použitých dojnic k analýze plemene česká strakatý skot (C100).**

K analýzám se použilo celkem 50 vzorků mléka. Vzorky se odebraly od 31 dojnic českého strakatého skotu a 19 dojnic holštýnského skotu. Dojnice byly na různých laktacích a různého věku. Nejvíce (celkem 14) se vyskytovaly dojnice

na 1. laktaci, nejméně (1 dojnice) na 10 laktaci. Z hlediska věku se rozpětí pohybovalo mezi 26 měsíci a 13 lety. Průměrný věk vykazoval 6 let.

#### **4.1. Izolace DNA**

Izolace DNA probíhala pomocí automatického izolátoru DNA MagCore H16 (NucleicAcid Extractor) za použití krevních kitů MagCore Genomic DNA. Během rozmrazování se vkládaly kity, jednorázové pipetovací špičky a kolony pro výslednou DNA do přístroje na své dané místo podle návodu. Po rozmražení se odpipetovalo 400 µl mléka z každého vzorku do vstupních kolon a také se vložily do přístroje. Na izolátoru byla navolena metodika pro izolaci DNA dle protokolu pro izolaci z krve. Práce zařízením trvala 48 min. Výsledná DNA měla objem 100 µl.

#### **4.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Postup přípravy reakce zahrnovalo několik operací. Nejprve se připravil reakční vzorek do připravených zkumavek o složení master mix, H<sub>2</sub>O, forward primer, reverse primer a DNA. Master mix se skládá, z dNTP směsi, MgCl<sub>2</sub> a reakčního pufru. Na jeden vzorek o objemu 20 µl se použilo 10 µl Master mixu, 5 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl každého primeru a 4 µl DNA. Výsledná směs se důkladně uzavřela, popsala, zvortexovala a vložila do termocykleru značky Bioer. Bylo nutné pracovat sterilně, a mezi jednotlivými pipetovanými komponenty měnit preferenčně špičky s filtrem pro zamezení kontaminace. Délka práce zařízením trvala 2 h a 20 min. Sekvence primerů byly následující:

E155F (Forward) 5'-CGC AGA CAA TGA AGT ATC TAA AAC-3'

E155R (Reverse) 5'-GAG GAG GTG GGT GCC TCA GA-3'.

### **4.3. Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)**

Štěpení se provádělo tak, že ze vzorku vyjmutého po PCR reakci se odpipetoval objem 15  $\mu$ l a přesunul se do jiné zkumavky. K tomuto vzorku se přidalo 1,7  $\mu$ l pufru a 1  $\mu$ l *TaqI* restriktázy. Mísení vzorků probíhalo tzv. na ledu, kvůli aktivitě *TaqI* restriktázy, ke které dochází již při pokojové teplotě. Reakce se promíchala, a vložila do inkubátoru. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 22 h. Délky jednotlivých alel po rozštěpení pomocí *TaqI* restriktázy měly délku: A – 125 a 274 bp, G – 39, 125 a 235 bp.

### **4.4. Kontrola izolované DNA, PCR fragmentů a genotypizace - elektroforéza**

Příprava gelu byla provedena odvážením 1,4 g agarózy a smíchána se 75 ml pufru TBE. Směs se vložila do mikrovlnné trouby a ohřála při 60 °C po dobu 2 - 3 min. Došlo k rozpuštění agarózy. Následně se směs nechala zchladit tak, aby nebyla vařící, ale zároveň aby příliš neztuhla. Do částečně zchlazeného gelu se přidalo 4  $\mu$ l barviva *ethidiumbromid* a směs se promíchala. Následně se gel nalil do speciální vaničky. Do gelu ve vaničce se ponořil tzv. hřeben, který po vyjmutí ze ztuhlého gelu vytvořil jamky ve tvaru obdélníku sloužící k nasazení vzorků. Vanička se usadila do elektroforetické vany, tak aby se jamky nacházely u záporného pólu. Vanička se zalila roztokem TBE tak, aby hladina dosahovala 2 mm nad gel. Do první jamky se vkládal hmotnostní marker tzv. laedder o objemu 10  $\mu$ l. laedder obsahuje soubor velikostně definovaných fragmentů, které umožňují identifikaci velikosti molekul DNA. Do ostatních jamek se vkládali vzorky s DNA o objemu 10  $\mu$ l. Vanička byla přikryta víkem a připojena ke zdroji. Napětí bylo zvoleno 90 V po dobu 1 h.

## 4.5. Vizualizace pod UV světlem

Po proběhlé elektroforéze se gel vyjmul z vaničky, položil na ták a přenesl k zařízení s UV zářením. Gel se vsunul dovnitř a důkladně se uzavřeli dvířka zařízení. Pomocí počítače a počítačového programu Genesys se zkontroloval výsledek a uložil se. Štěpená DNA byla patrná jako celistvé vysokomolekulární proužky.

## 4.6. Metody pro zpracování výsledků

Z výsledků genotypizace, zjištěné ze snímku pod UV zářením, se odlišily jednotlivé kombinace alel *AA*, *AG* a *GG*. Pro plemeno holštýnský skot a český strakatý skot se vypočetla relativní frekvence genotypů, absolutní frekvence a relativní frekvence alel.

Potřebné výpočty:

Relativní frekvence genotypů

$$AA^R = AA^A/N$$

$$AG^R = AG^A/N$$

$$GG^R = GG^A/N$$

Absolutní frekvence alel

$$A^A = 2xAA^A + AG^A$$

$$G^A = 2xGG^A + AG^A$$

Relativní frekvence alel

$$A^R = \frac{2x_{AA^A} + AG^A}{2xN}$$

$$G^R = \frac{2x_{GG^A} + AG^A}{2xN}$$

Použitý horní index R vyjadřoval relativní frekvenci a horní index A vyjadřoval absolutní frekvenci. Písmenem N byl označen počet jedinců v dané populaci.

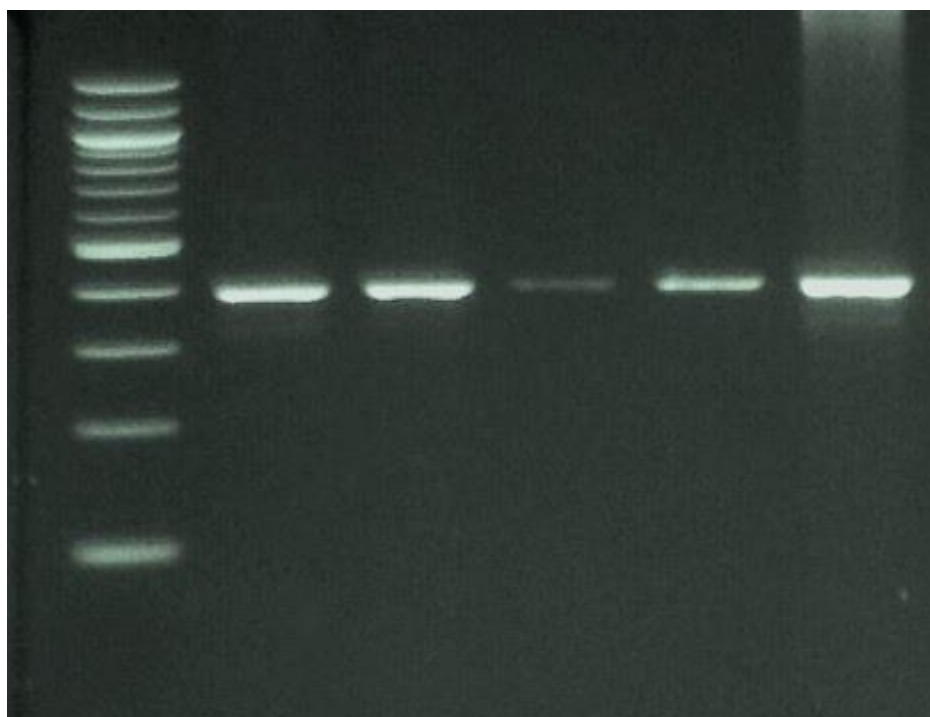
#### **4.6.1. Statistické vyhodnocení – ANOVA**

Pomocí programu Statistika a její funkce ANOVA se zjišťovalo, zda mají jednotlivé genotypy u plemene holštýnský skot a český strakatý skot, vliv na počet somatických buněk v mléce.

## 5. Výsledky a diskuse

### 4.1 Genotypizace

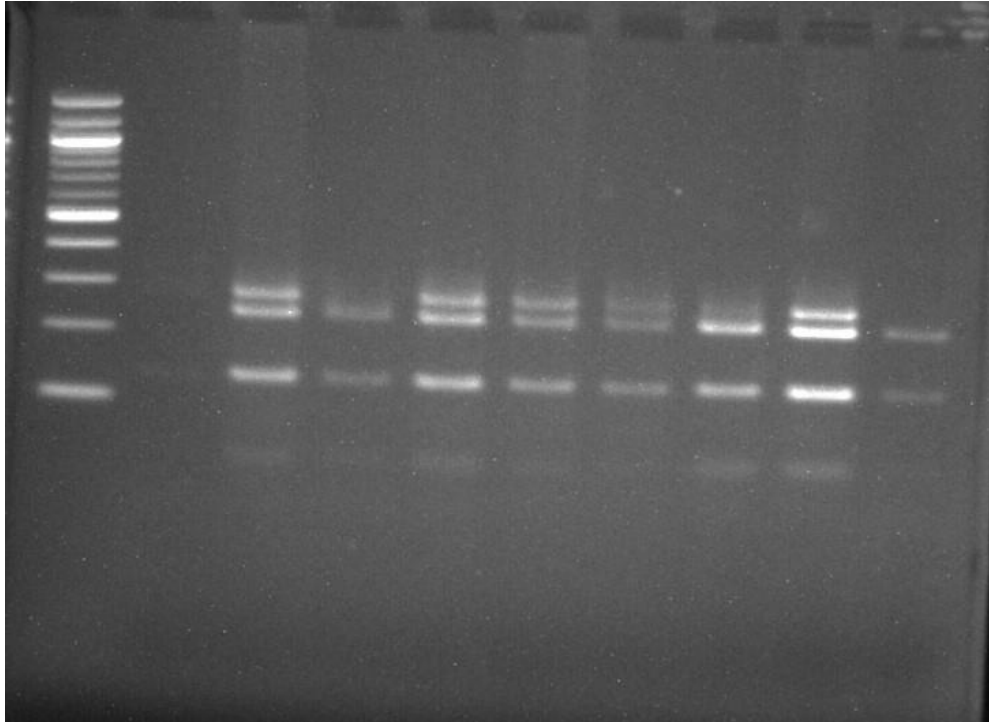
Pomocí komerčních kitů se vyizolovalo DNA z 50 vzorků mléka. Jednalo se o 19 vzorků plemene holštýnského skotu a 31 vzorků plemene českého strakatého skotu. Metodou PCR/RFLP proběhla genotypizace lokusu CGIL4. Přítomnost lokusu CGIL4 byla detekována na fragmentu 399 bp. Vizualizaci PCR - fragmentů lze shlédnout na obr. č. 1.



Obr.č.1. Výsledek po elektroforetické separaci PCR – fragmentu v lokusu CGIL4.

Metoda RFLP vyžadovala přidání restričního enzymu *TagI* do štěpné reakce. Výsledek bylo možné detekovat po elektroforetické separaci na agarózovém gelu. Vizualizace proběhla opět pod UV světlem. Pro alelu A v lokusu CGIL4, se určily fragmenty o délce 125 bp a 274 bp. Pro alelu G, se vyskytovaly tři fragmenty o délce 39 bp, 125 bp a 235 bp. Výsledek RFLP reakce si lze prohlédnout na obr.č.2.





Obr.č.2. Vizualizace PCR/RFLP reakce na agarózovém gelu vizualizované pod UV světlem.

### 5.1. Frekvence genotypů a frekvence alel

Z 19 jedinců plemene Holštýnský skot se určily genotypy *AA*, *GG* a *AG* pro lokus *CGIL4*. Následně se provedly výpočty absolutní a relativní frekvence genotypů, jejichž výsledky se zaznamenaly v tab. č. 5. Výskyt genotypů *AG* a *AA* byl přibližně stejný. Nejvíce se vyskytovali heterozygoti *AG*, v počtu 8 jedinců (0,42). Tento fakt platil i ve studii Wiltona *et al.* z roku 1972. Wilton *et al.* zjistili výskyt heterozygotů v dané populaci s výskytem 61 %.

Za výskytem heterozygotů se umístili homozygoti *AA*, v počtu 7 jedinců. Nejméně bylo homozygotů *GG*, pouze 4 jedinci.

Frekvence	Genotyp		
	AA	GG	AG
Absolutní	7	4	8
Relativní	0,37	0,21	0,42

**Tab.č.5. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence genotypů populace holštýnského skotu.**

Výpočty absolutní a relativní frekvence alel u populace holštýnského skotu se zjistilo, že převažovala alela A (0,58) nad alelou G (0,42). Výsledek si lze prohlédnout v tab.č.6.

Obdobného výsledku dosáhla studie Sharmy *et al.* z roku 2006. Tato studie vyvodila vyšší frekvenci alel CGIL4 (A) v rezistentní skupině. Naopak ve studii Čítek *et al.* z roku 2011 se frekvence alel CGIL4(A) a CGIL4 (G) významně nelišila.

Frekvence	Alela	
	A	G
Absolutní	22	16
Relativní	0,58	0,42

**Tab.č.6. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence alel populace holštýnského skotu.**

U populace českého strakatého skotu proběhly obdobné výpočty frekvence genotypů pro lokus CGIL4, jako u holštýnského skotu. Z 31 jedinců se určily genotypy AA, GG a AG. Nejvíce se vyskytovali heterozygoti AG. Zjistilo se 14 jedinců. Obdobně vyšla studie Wiltona *et al.* O něco méně se v populaci vyskytovali homozygoti GG, v počtu 12 jedinců. Nejméně se zjistilo homozygotů AA. Jejich počet byl pouze 5 jedinců. Výpočty absolutní a relativní frekvence alel se shrnula v tab. č.7.

Frekvence	Genotyp		
	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>AG</i>
<b>Absolutní</b>	5	12	14
<b>Relativní</b>	0,16	0,39	0,45

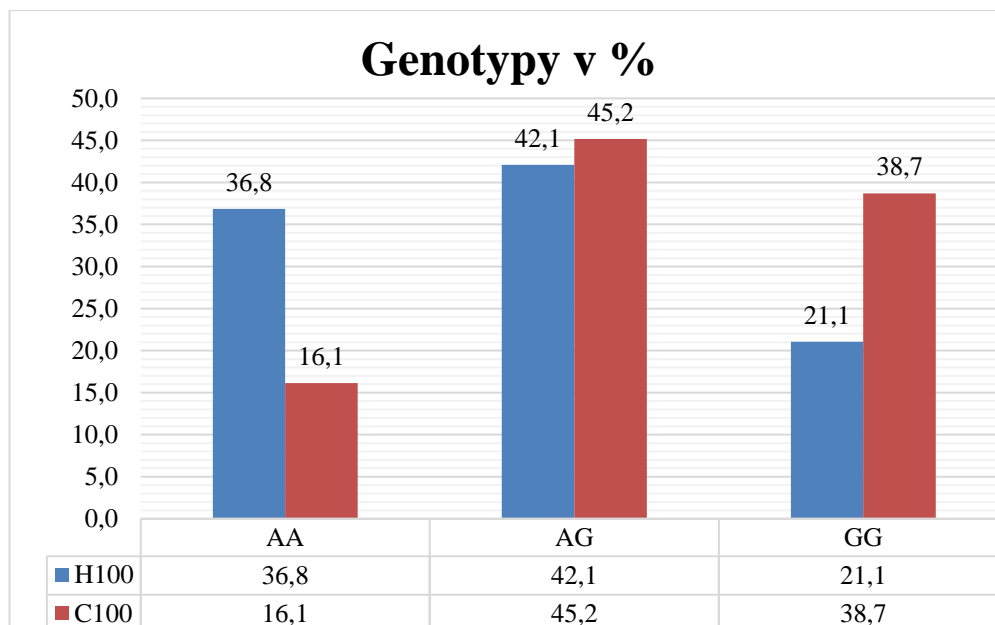
**Tab.č.7. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence genotypů populace českého strakatého skotu.**

U populace českého strakatého skotu proběhly také výpočty absolutní a relativní frekvence alel. Z výsledků je zjevné, že alela *G* (0,61) výrazně početně převažovala alelu *A* (0,39), což je opačný stav oproti výsledkům u holštýnského skotu. Tento fakt je také v rozporu s výsledky Sharmy *et al.*, který prokázal, že *A* převažovala alelu *G* v dané populaci. Více se k těmto výsledkům přiblížila studie Čítka *et al.* Ikdyž se frekvence alel *CGIL4 (A)* a *CGIL4 (G)* významně nelišila, frekvence alel *CGIL4 (G)* byla mírně vyšší.

Frekvence	Alela	
	<i>A</i>	<i>G</i>
<b>Absolutní</b>	24	37
<b>Relativní</b>	0,39	0,61

**Tab.č.8. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence alel populace českého strakatého skotu.**

Pro lepší představu se rozdílnost výskytu jednotlivých genotypů u obou plemen procentuálně znázornila v grafu č.1.



**Graf č.1. Procentuální zastoupení genotypů u obou plemen.**

U všech dojnic zvolených pro analýzu, proběhly výpočty absolutních a relativních frekvencí genotypů a alel pro lokus *CGIL4* dohromady, bez ohledu na plemeno. Do výpočtu se zahrnuje 50 dojnic. Výsledky absolutní a relativní frekvence genotypů ukázaly, že se v této populaci nadále nejvíce vyskytovali heterozygoti. Počet heterozygotů *AG* byl 22 jedinců. Tento fakt stále souhlasí se studií Wiltona *et al.* Dále vyskytovali homozygoti *GG*, v počtu 16 jedinců. Nejméně se v populaci nacházeli homozygoti *AA*. Jejich počet vykazoval 12 jedinců. Výsledky se zahrnuly v tab.č.9.

Frekvence	Genotyp		
	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>AG</i>
<b>Absolutní</b>	12	16	22
<b>Relativní</b>	0,24	0,32	0,44

**Tab.č.9. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence genotypů populace obou plemen.**

Po výpočtech absolutních a relativních frekvencí alel u této populace se zjistilo, že výskyt alel *A* (0,46) a alel *G* (0,54) nevykazoval žádný významný rozdíl. Alel *G* se zjistilo v populaci více, v nepatrném rozdílu. Výsledek se shoduje se studií Čítka *et al.*

Frekvence	Alela	
	<i>A</i>	<i>G</i>
Absolutní	46	54
Relativní	0,46	0,54

**Tab.č.10. Výsledky výpočtů absolutní a relativní frekvence alel populace českého strakatého skotu.**

## **5.2. Vliv genotypu na počet somatických buněk v mléce**

Pomocí programu Statistika a její funkce ANOVA se vyhodnotil vztah mezi genotypy a počtem somatických buněk v mléce. Použitá data PSB se získala z kontroly užitkovosti za období od března 2015 do února 2018. V populaci holštýnského skotu, ani v populaci českého strakatého skotu nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na počet somatických buněk ( $P > 0,05$ ), viz. tab. 11 a 12.

Výsledky zcela nesouhlasí s výsledky Sharmy *et al.* z roku 2006 a Harmona *et al.* z roku 1994 které tvrdí, že lokus CGIL4 má vliv s PSB a s výskytem mastitid u dojnic. Naopak výsledky studie souhlasí s Čítkem *et al.* z roku 2011. Ta tvrdí, že chovné hodnoty PSB v mléce pro genotypy a alely CGIL4 nevykazovaly žádný významný rozdíl, a proto lokus neměl v této analýze vliv na chovatelskou hodnotu somatických buněk.

Genotypy CGIL4	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P
H 100	1,078462E+12	1	1,078462E+12	25,20721	0,000126
C 100	1,467287E+12	1	1,467287E+12	46,32122	0,000000

**Tab.č.11. Výsledky ANOVA pro lokusCGIL4**

V tabulce č.12. se uvedly průměrné hodnoty PSB genotypů lokusu CGIL4 u obou plemen. Průměrné hodnoty PSB u populace českého strakatého skotu se významně nelišily. Rozdíl v průměrném stavu PSB se nacházel u holštýnského skotu. Nejvyšší průměr PSB měla populace holštýnského skotu 304833,2988; a nejnižší 150067,4216. Celkově populace českého strakatého skotu obsahovala o 1,87 % více PBS v této studii.

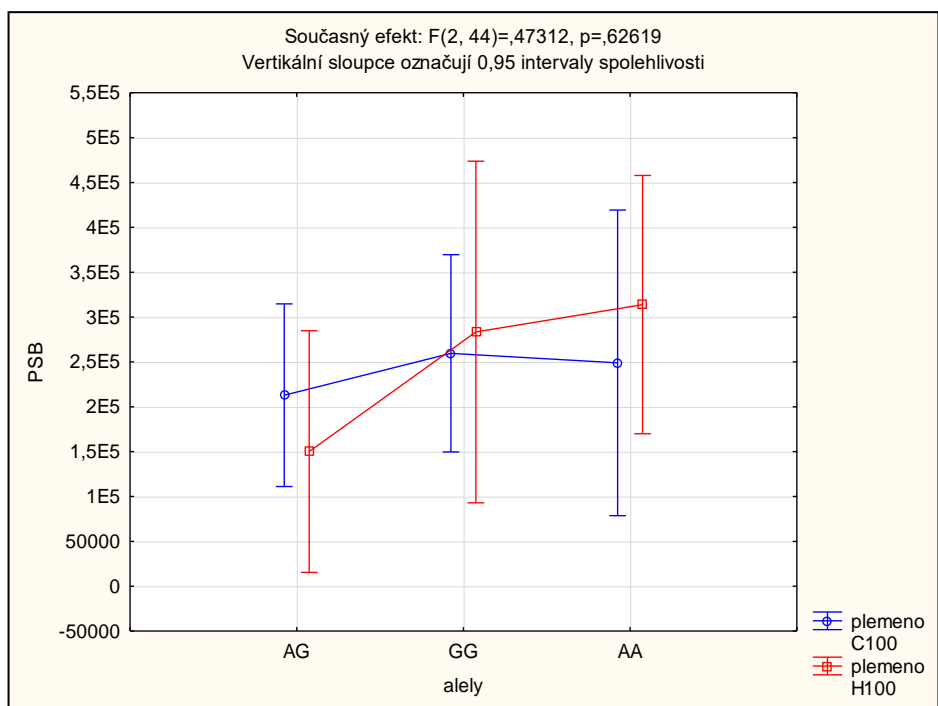
H 100	Genotyp	Počet	Průměr PSB
	AA	7	304833,2988
	GG	4	283382,6167
	AG	8	150067,4216
C 100	AA	5	251896,9264
	GG	12	259607,0892
	AG	14	212937,0334

**Tab.č.12. Průměrné hodnoty PSB.**

Studie Čítka *et. al.* proběhla u plemen holštýnského skotu a simentálského skotu. Předpokladem této hypotézy bylo, že simentálský skot bude odolnější vůči mastitidě, vzhledem k vícestrannému využití. Vzhledem i k vícestrannému využití plemena český strakatý skot, by se dala také předpokládat vyšší odolnost vůči mastitidě. Bohužel výsledky dvoufaktorové ANOVY ( $P > 0,05$ ) i v této studii prokázaly, že na PSB nemá vliv genotyp lokusu CGIL4 ani plemenná příslušnost, viz. tab. č. 13 a graf č. 2.

Vliv genotypu a plemena na PSB	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	P
	2,472311E+12	1	2,472311E+12	69,22247	0,000000

**Tab.č.13. Výsledky ANOVA pro vliv genotypu a plemene na PSB.**



**Graf č. 2. Výsledky ANOVA pro vliv genotypu a plemene na PSB.**

## 6. Závěr

Cílem práce byla studie markeru CGIL4 v závislosti na počtu somatických buněk v mléce, které jsou hlavním indikátorem při detekci mastitid. Analýza proběhla u populace skotu plemen holštýnský skot a český strakatý skot. Vzorky mléka se odebíraly od 50 ti dojnic v podniku ZOD Předslavice. Ze vzorků proběhla izolace DNA, které se vystavilo štěpné reakci PCR / RFLP. Následně proběhla elektroforéza na agarozovém gelu. Gel se vizualizoval pod UV světlem, kde se určila genotypizace lokusu. Po určení genotypizace AA, GG a AG, proběhly výpočty frekvence genotypů a frekvence alel. V tomto případě bylo v populaci nejvíce heretozygotů AG u obou plemen. Frekvence alel ukázala, že v případě populace holštýnského skotu se vyskytovala více alela A, naopak u českého strakatého skotu alela G. V případě, že se frekvence alel počítala za celou populaci, bez ohledu na plemeno, byl výskyt obou alel přibližně stejný.

Vliv genotypů markeru CGIL4 na počet somatických buněk se vyhodnotil statisticky. Data se získala u kontroly užítkovosti za určité období. Analýza vyhodnotila, že neexistuje vztah mezi genotypy markeru CGIL4 a počtem somatických buněk (PSB) u obou plemen ( $P > 0,05$ ). Výpočty průměrných hodnot prokázaly, že nejvíce somatických buněk se vztahovalo ke genotypu AA u holštýnského skotu a nejméně u genotypu AG opět u téhož plemene. U populace českého strakatého skotu se detekovalo o 1,87 % průměrných hodnot PSB oproti druhému plemeni.

Vzhledem k vícestrannému využití plemene český strakatý skot, by se předpokládala vyšší odolnost vůči mastitidě. Proběhla analýza pomocí funkce ANOVA ke vztahu dvou znaků k výskytu PSB. Jednalo se o znaky genotypizace a plemenná příslušnost. Bohužel i tato analýza neprokázala žádný prokazatelný vztah k PSB.



## 6. Použitá literatura

- BRZÁKOVÁ, M. *et al.*, *Genetické hodnocení dlouhověkosti masného skotu*. Náš chov. 9/2017. 32 str. ISSN:0027-806.
- COHEN – ZINDER, M. *et al.*, *Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle*. 2005. *Genome Research* 15, 936–44.
- CONRAD, H. R. *et al.*, *Selenium and vitamin E in bovine mastitis*. 1986. In *Proceedings of Symposium on mastitis control and hygienic production of milk* (pp. 43–48). Espoo, Finland.
- ČÍTEK, J. *et al.*, *Polymorphisms in CGIL4, breeding value for static cell count and resistance to mastitis*. Department of Genetics, Animal Breeding and Nutrition, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 2011. 56:301-304.
- DE HAAS, Y. *et al.*, *Genetic parameters of pathogen-specific incidence of clinical mastitis in dairy cows*. 2002. *Anim. Sci.* 74: 233–242.
- DE OLIVY, A. *et al.*, *Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep*. 2013. *J. of Dairy Sci.* 96 (12), p. 7698 - 7708.
- DE VliegHER, S *et al.*, *Mastitis in dairy heifers. Nature of the disease potential, impel, preventive, and control*. 2012. *J. of Dairy Sci.*, 95 (3), p. 1025 - 1040.
- DOLEŽAL, O., *et al.*, *Mléko, dojení, dojírny*. Praha: Agrospoj, 2000. 241 s.
- ERSKINE, R. J. *et al.*, *Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts*. 1987. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(11), 1417–1421.
- FRYDRYCHOVÁ ČAPKOVÁ, R. *et al.*, *V. Kurz základních metod molekulární biologie*. 2018. Biologické centrum AV ČR, České Budějovice. Ekotech.

GRISART, B. *et al.*, *Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition*. 2002. *Genome Research* 12, 222–31.

GU, Z. *et al.*, (2007) *Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland*. 2007. *FEBS Letters* 581, 981–8.

HARMON, R. J. *Psychology of mastitis and factors affecting static cell counts*. *J. Dairy Sci.* 1994. 77:2103-2112.

HAYES, B. J. *et al.*, *Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges*. 2009. *J. Dairy Sci.* 92: 433–443.

HEJLÍČEK, *et al.*, *Mastitidy skotu*. 1987. Praha. Státní zemědělské nakladatelství. 208 str.

HILLERTON, J. E. *et al.*, *Bovine Medicine; Diseases and Husbandry of Cattle* (pp. 337–340). Oxford, UK; Ames, Iowa: 2004. Blackwell Science/Iowa State Press. 4.

ILLEK, J. *et al.*, *Produkční zdraví u dojnic*. *Náš chov*. 12/2016. 62 str. ISSN: 0027-8068.

ILLEK, J. *et al.*, *Produkční zdraví u dojnic*. *Náš chov*. 12/2016. 62 str. ISSN: 0027-8068.

JEŽKOVÁ, A. *O nejlepší a nejzdravější stádo a dojnici*. *Náš chov*. 2/2017a. Str. 79. ISSN: 0027-8068.

JEŽKOVÁ, A. *Úloha hygieny v chovech dojnic*. *Náš chov*. 5/2017b. 62 str. ISSN: 0027-8068.

JONES, G. F. *et al.*, *Cause, occurrence, and clinical signs of mastitis and anorexia in cows in a Wisconsin study*. 1989. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195(8), 1108–1113.

- KESTER, H., J. *et al.*, *Activity and milk compositional changes following experimentally induced Streptococcus uberis bovine mastitis*. 2015. *J. of Dairy Sci.*, 98 (2), p. 999-1004.
- KOUKOLOVÁ, M. *et al.*, *Vliv výživy na kvalitu mléka*. *Náš chov*. 2/2017. 88 str. ISSN: 0027-8068.
- KOVÁČ, G. *Choroby hovädzieho dobytku*. Prešov M & M, 2001. 874 s. ISBN 80-889-5014-7.
- KUNGLAND, H. *et al.*, *Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle*. *Mamm. Genome*. 2001.12:837-842.
- LEYVA – BACA, I. *et al.*, (2008) *Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada*. 2008. *Journal of Dairy Science* 91, 407–17.
- LI, N *et al.*, *Role of somatic cells on dairy processes and products: a review*. 2014. *Dairy Sci. Technol.*, 94(6), p. 517-538.
- MCDUGALL, S. *et al.* 2001. *Relationships among static cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation*. 2001. *Small Rumin.* 245–254.
- OGOREVC J. *et al.*, *Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis*. 2009. *Animal Genetics*, 40(6), 832-851.
- PIGHETTY. *Šance pro zlepšení kvality mléka*. *Chov skotu*. Č.6/214. ISSN:1801-5409.
- RAJALA, P. J. *et al.*, *Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows*. 1998. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(1), 1–13.
- ROCHE, J. F. *The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency*. 2006. *Animal reproduction science*. 96 (3-4). 282-296.

RON, M. *et al.*, *Combining mouse mammary gland gene expression and comparative mapping for the identification of candidate genes for QTL of milk production traits in cattle*. 2007. BMC Genomics 8, 183.

RUEGG, P, L. *Management ve stádě dojnic, ustájení a dojení pro minimalizaci a výskyt mastitid*. *Náš chov*. 2/2017. 70 str. ISSN: 0027-8068.

RUPP, R. *et al.*, *Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins*. 2007. Journal of Dairy Science **90**, 1029–38.

SANCHEZ, L. *et al.*, *Biological role of lactoferrin*. Arch. Dis. Child. 1992. 67:657-661.

SANTOS, MV *et al.*, *Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk during Shelf-Life Storage*. 2003. J. of Dairy Sci., 86 (8), p. 2491-2503.

SATTLER, *et al.*, *Šance pro zlepšení kvality mléka*. Chov skotu. 12/2014. ISSN: 1801-5409.

SELVAN, S. A. *et al.*, *Molecular characterization and combined genotype association study of bovine cluster of differentiation 14 gene with clinical mastitis in crossbred dairy cattle*. 2016. Vet World, 9(7), 680-684.

SEYFERT, H, M. *et al.* *Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter*. Gene. 1994. 143:265-269.

SHARMA, S, B. *et al.*, *Detection and Characterization of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers for Clinical Mastitis in Canadian Holsteins*. 2006. J. Dairy Sci. 89:3653-3663.

SHOOK, G. E. *Major advances in determining appropriate selection goals*. 2006, Journal of Dairy Science 89, 1349–61.

SCHADT, E.E. *Novel integrative genomics strategies to identify genes for complex traits*. 2006. Animal Genetics 37, 18–23.

SCHLMAN, N, F. *et al.*, *Quantitative trait loci for health trait in Finnish Ayrshire cattle*. J. Dairy Sci. 1997. 87:443-449.

SILVERI, L. *et al.*, *MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer*. 2006. Reproduction Nutrition Development 46, 549–56.

SMETANA, P. *et al.*, *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství*. Metodika pro praxi. 2009. Bioinstitut. ISBN: 978-80-904174-5-8.

VELECHOVSKÁ, J. *Boj proti zánětům nikdy neskončí*. Náš chov. 3/2017. 28 str. ISSN: 0027-8068.

VELECHOVSKÁ, J. *Boj proti zánětům nikdy neskončí*. Náš chov. 3/2017. 28 str. ISSN: 0027-8068.

WANG. *et al.*, (2007) *Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle*. 2007. Journal of Genetics and Genomics 34, 406–12.

WHITAKER, D. A. *et al.*, *Disposal and e rates in British dairy herds between April 1998 and March 2002*. 2004. The Veterinary Record, 155(2), 43–47.

WILTON, J, W. *et al.* *Genetic and environmental aspects of udder infections*. J. Dairy Sci. 1972. 55:183-193.

ZAVADILOVÁ, L. *et al.*, *Šlechtění proti výskytu klinické mastitidy u dojnic*. Náš chov. 2/2017. Str.76. ISSN: 0027-8068.

## 6.1. Internetové zdroje

ANONYM 2. *Mastitidy obecně*. 2017. Agropress.cz. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/mastitidy/> (cit. 9.8. 2017).

ANONYM 3. *Mastitidy*. Zootechnika.cz. 2017. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/choroby-prezvykavcu/mastitidy.html> (cit. 11.9. 2017).

ANONYM 4. *Složení a vlastnosti mléka*. Výživa ve zdraví i nemoci. 2010. Dostupné z: <http://www.lecvyziva.estranky.cz/clanky/prispevky/slozeni-a-vlastnosti-mleka.html> (cit. 7.10. 2017).

ANONYM 6, *Mastitidy z pohledu chovatele*. Eurofarmystems. 2017. Dostupné z. <http://www.eurofarm.cz/sites/www.eurofarm.cz/files/mastitidy-z-pohledu-chovatele-www.pdf> (cit. 14.1. 2018).

ANONYM 7, *O dojení 1. část*. Domáci mlékař. 2016. Dostupné z: <http://www.domacimlekar.com/o-dojeni-1-cast/> (cit. 14.1.2018).

BRADLEY, A. *et al.*, *Coliform mastitis-the importance of the dry period*. In *Proceedings British Mastitis Conference Shepton Mallet (pp. 28–36)*. 2000. Retrieved from <http://www.britishmastitisconference.org.uk/BMC2000papers/Bradley.pdf> (11.4.2018).

BRZDIL, J. JAGLIČ, Z. *Stafylokoky a zdraví mléčné žlázy*. *Náš chov*. 2/2015. Dostupné z: <http://naschov.cz/stafylokoky-a-zdravi-mlecne-zlazy-skotu/> (cit. 12.9. 2017).

BUCEK. *Vývoj odhadu plemenných hodnot pro rezistenci k mastitidám pro dojený skot v Kanadě*. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. 2011. Dostupné z: <http://cmsch-demo.cmsch.cz/store/vyvoj-odhadu-plemennych-hodnot-pro-rezistenci-k-mastitidam-pro-dojeny-skot-v-kanade.pdf> (cit. 7.11. 2017).

ČMSCH a.s., Dostupné z: <http://old.cmsch.cz/somaticke-bunky/> (cit. 7.8. 2017).

DIETSCHE. *Replikace DNA: =přenos informace z DNA do DNA*. COURSEHERO.COM. 2017. Dostupné z: <https://www.coursehero.com/file/7305169/Replikace-DNA/> (cit. 4.11. 2017).

DVORSKÝ, L. *Spokojené krávy více dojí*. 2007. Holsteininternational. Dostupné z: <http://www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/mastitidy-u-skotu/96-spokojene-kravy-vice-doji> (2.1.2018).

ELLIS, K. A. *et al.*, *Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK*. 2007. *The Journal of Dairy Research*, 74(3), 302–310. <https://doi.org/10.1017/S002202990700249X> (6.1. 2018).

HOGAN, J. *et al.* *Managing Environmental Mastitis*. 2012.. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa>. (cit. 3.9. 2017).

CHLÁDEK, G *et al.*, *Dopady tepelného stresu u dojnic*. 2007. ÚSTAV CHOUVU S ŠLECHTĚNÍ ZVÍŘAT AF MZLU V BRNĚ. Dostupné z: [https://www.cestr.cz/files/skalak\\_2009/dopadytepstresuc.pdf](https://www.cestr.cz/files/skalak_2009/dopadytepstresuc.pdf) (cit. 8.8.2017).

KOLLAR, S. *Mastitidy*. MVDr. Stanislav Kollar. 2008. Dostupné z: [http://www.kollarmvdr.cz/clanky/mastitidy\\_137.html](http://www.kollarmvdr.cz/clanky/mastitidy_137.html) (cit. 10.9. 2017).

LIŠKA, K. *Základní body programu prevence a tlumení mastitid*. Genoservis.cz. 2006. Dostupné z: <http://www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/mastitidy-u-skotu/382-zakladni-body-programu-prevence-a-tlumeni-mastitid> (cit. 10.9. 2017).

MADOUASSE, A. *et al.*, *Somatic cell count dynamics in a large sample of dairy herds in England and Wales*. 2010. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1-2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.05.005> (4.11. 2017).

MACHÁČEK, T. *et al.*, *Genové interakce*. Biomach.cz. 2012. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/genetika/genove-interakce> (cit. 4.11. 2017).

MELXNER, F. *Tepelný stres a mastitidy dojnic*. *Náš chov*. 9/2001. Dostupné z: <http://naschov.cz/tepelny-stres-a-mastitidy-dojnic/> (cit. 11.8. 2017).

NORBERG, *et al.*, *Kontrola zdravotního stavu mléčné žlázy dojených krav*. Českomoravská společnost chovatelů. 2007. Dostupné z: <http://cmsch-demo.cmsch.cz/store/2007-kontrola-zdravotniho-stavu-mlecne-zlazy-dojenych-krav.pdf> (cit. 12.9. 2017).

OSIČKA, V. *et al.*, *O zdraví mléčné žlázy*. *Náš chov*. 1/2013. Dostupné z: <http://naschov.cz/o-zdravi-mlecne-zlazy/> (cit. 11.9. 2017).

OSIČKA, V. *Stres, tepelný stres v chovu dojnic*. Genoservis.cz. 2007. Dostupné z: <http://www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/mastitidy-u-skotu/94-stres-tepelny-stres-v-chovu-dojnic> (cit. 11.8. 2017).

PADUCH, J.H. *et al.*, *The association between bedding material and the bacterial counts of Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle*. 2013. The Journal of Dairy Research, 80(2), 159–164. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000046> (cit. 6.11. 2017).

PAPOUŠEK, I. *Polymerázová řetězová reakce (PCR)*. 2013. Molekulární biologie v hygieně potravin. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/prednasky/mbhp\\_2014\\_04.pdf](https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/prednasky/mbhp_2014_04.pdf) (cit. 6.11. 2017).

PAPOUŠEK, I. *Enzymy v molekulární biologii Polymorfismus délek restričních fragmentů (RFLP)*. 2016. Molekulární biologie v hygieně potravin – Molekulárně biologická analýza potravin Přednáška 3. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/mol-biologie-v-hygiene-potravin/mbhp\\_2017\\_03.pdf](https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/ubchvzz/materialy/mol-biologie-v-hygiene-potravin/mbhp_2017_03.pdf) (cit. 6.11. 2017).

PAZDERA, J. *Transgenní krávy odolné proti mastitidě*. 2005. Objektive Source E-Learning. Dostupné z: <http://www.osel.cz/1210-transgenni-kravy-odolne-proti-mastitide.html> (cit. 9.8. 2017).

RYSOVÁ, L. *Základní prevence vzniku mastitid*. 2017. AGROPRESS.CZ. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/zakladni-prevence-vzniku-mastitid/> (cit. 7.8. 2017).

RYŠÁNEK, D. *Imunoprofylaxe mastitid – Skutečnost a vize*. Veterinářství. 2010. Dostupné z: <http://vetweb.cz/immunoprofylaxe-mastitid-skutecnost-a-vize/> (cit. 13.10. 2017).

SANDO, L. M. *et al.*, *QTLs preodolnosť proti mastitide u dobytká*. 2007. Dostupné z: <http://skpatents.com/70-e14553-qtls-pre-odolnost-proti-mastitide-u-dobytky.html> (cit. 21.10.).



SEYDLOVÁ, R. *Zdravotní stav mléčné žlázy po otelení*. Zemědělec.cz. 1/2011. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/zdravotni-stav-mlecne-zlazy-po-oteleni/> (12.10. 2017)

SCHULTE, H.F., Hoard's Dairyman 6/2003, přeložil Lumír Dvorský, Genoservisa.s Dostupné z: <http://doczz.cz/doc/20833/%C4%8Dtvrtletn%C3%ADk-z%C3%A1%C5%99%C3%AD-2003> (cit, 14.1. 2014).

STANĚK, S. *Mastitidy*. Zootechnika.cz. 2017. Dostupné z [:http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/choroby-prezvykavcu/mastitidy.html](http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/choroby-prezvykavcu/mastitidy.html) (cit. 12.10. 2017).

ŠÍPEK, A. *Slovník genetických pojmů*. [www.genetika-biologie.cz](http://www.genetika-biologie.cz).2014. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/slovník> (cit. 25.10. 2017)

ŠTOSSOVÁ, J. *Mastitidy*. 2016. Eurofarmystems s.r.o. Dostupné z: <http://docplayer.cz/6065088-Mastitidy-mvdr-jana-stossova-eurofarm-systems-s-r-o.html> (cit. 10.8. 2017).

URBAN, P. *Převod počtu somatických buněk na lineární skóre*. 2016. ČMSCH a.s. Dostupné z: <http://old.cmsch.cz/somaticke-bunky/> (cit. 7.8. 2017).

VAN GASTELEN *et al.*, *A study on cowcomfort and risk for lameness and mastitis in relation to different types of bedding materials*. 2011. Journal of Dairy Science, 94(10), 4878–4888. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4019> (cit. 8.10. 2017).

VAN GASTELEN, S. *et al.*, *A study on cowcomfort and risk for lameness and mastitis in relation to different types of bedding materials*. 2011. Journal of Dairy Science, 94(10), 4878–4888. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4019> (cit. 8.10. 2017).

VARGOVÁ, A. *Úvod do genetiky*. 2017. Dostupné z: <http://www.gcm.sk/www/predmety/biologia/dok/genetika.pdf> (cit. 4.11. 2017).

VĚŘÍŠ, M. *Faremní kultivace původců mastitid pomocí PM testů*. 2016. MSD Farmářské Forum. Dostupné z: [http://www.msd-farmarske-forum.cz/data/files/MSD\\_Faremni\\_kultivace.pdf](http://www.msd-farmarske-forum.cz/data/files/MSD_Faremni_kultivace.pdf) (11.9 2017).

VĚŘÍŠ, M. *Faremní kultivaci proti mastitidám*. Seminář. *Náš chov*. 2/2017. Dostupné z: <http://naschov.cz/faremni-kultivaci-proti-mastitidam/> (cit. 10.8. 2017).

VOKŘÁLOVÁ, J. *et al.*, *Hygiena stájového prostředí dojnic*. Zemědělec.cz. 11/2007. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/hygiena-stajoveho-prostredi-dojnic/> (8.10. 2017).

WEISS, W. P. *et al.*, *Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds*. 1990. *Journal of Dairy Science*, 73(2), 381–390. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78684-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78684-5) (cit. 2.1. 2018).

WESTERLAAN, B. *O zdraví mléčné žlázy*. *Náš chov*. 2013. Dostupné z: <http://naschov.cz/o-zdravi-mlecne-zlazy/> (cit. 14.1. 2018).

WOLFOVÁ, M. *Možnosti šlechtění na rezistenci proti mastitidě*. *Náš chov*. 1/2001. Dostupné z: <http://naschov.cz/moznosti-slechteni-na-rezistenci-proti-mastitide/> (cit. 16.8. 2017).

ZELINKOVÁ, G. *Problematika buněčných elementů v chovech skotu*. *Vibrac.cz*. 2017. Dostupné z: <https://cz.virbac.com/home/odborne-clanky/skot/main/skot/problematika-bunnych-element-v-c.html> (8.10. 2017).

## 6. Přílohy

<b>Kategorie</b>	<b>Počet (ks)</b>
Telata do 6 měsíců	177
Jalovice	305
VB Jalovice	76
Dojnice	432
Výkrm skotu	153
Plemenný býk	1
KBTPM	16
Telata masná	10
Celkový počet skotu	1170

**Tab. č. 14– Struktura chovu skotu ZOD Předslavice.**

<b>Číslo dojnice</b>	<b>Prodělané mastitidy</b>	
393 778	14.7.2017	
568 290	29.5.2017	
537 448	12.3.2017	1.8.2017
568 218	8.3.2018	12.4.2017
451 286	9.1.2018	
337 196	6.3.2017	6.4.2017
568 112	14.2.2017	
494 166	31.5.2017	
412 965	26.8.2017	
568 260	26.8.2017	
568 134	16.10.2017	7.2.2018
568 259	5.5.2017	
239 167	9.8.2017	
494 269	9.8.2017	
537 448	7.9.2017	
451 206	5.2.2018	
568 114	5.9.2017	
494 137	11.12.2017	
393 799	13.9.2017	
337 148	9.3.2018	

**Tab.č.15. Záznam prodělaných mastitid u analyzovaných dojnic od srpna 2017 do března 2018.**