

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Agroekologie  
Katedra: Genetiky a speciální produkce rostlinné  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Testování mutací genů v asociaci k některým významným  
dědičným onemocněním u border kolie**

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Konzultanti diplomové práce: Ing. et Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.  
Ing. Kateřina Vernerová  
Autor diplomové práce: Bc. Lenka Krejčová

České Budějovice, 2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka KREJČOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15298**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Agroekologie - Péče o krajinu**  
Název tématu: **Testování mutací genů v asociaci k některým významným dědičným onemocněním u border kolie**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Mutace v genu *MDR1* (multidrug resistance gene) je u psů asociována s přecitlivělostí na určité druhy léků. Mutace způsobuje náchylnost zvířete k potenciálně smrtelné neurotoxicitě. Syndrom uvězněných neutrofilů (TNS; Trapped Neutrophil Syndrome) je způsoben delecí čtyř párů bází GTTT v exonu 19 genu *VPS13B*, která má za následek předčasné zařazení stop kodonu během translace. Mutace vede k narušení správné funkce neutrofilů. Imerslund-Gräsbeck syndrom (IGS; střevní malabsorpce kobalaminu) je geneticky podmíněná metabolická porucha, charakterizovaná zejména neutropenií, snížením hladiny kobalaminu v krevním séru a neregenerativní anémií. U border kolie je způsobena mutací v genu *CUBN* (cubilin), která vede k malabsorpci kobalaminu střevní sliznicí. Cílem diplomové práce je zpracovat literární přehled sumarizující dosavadní poznatky o uvedených geneticky podmíněných chorobách a analyzovat genotypy u souboru vzorků odebraných od jedinců plemene border kolie. DNA bude izolována ze stěrů z bukalní sliznice. Analýza mutace genů bude prováděna metodou PCR-RFLP. V literární rešerši shrňte dosavadní poznatky o jmenovaných dědičně podmíněných chorobách. Ze vzorků biologického materiálu vyizolujte DNA a po její amplifikaci proveďte restriční analýzu. Vyhodnoťte jednotlivé genotypy příslušných genů u souboru zvířat. Proveďte analýzu genetické struktury populace.

Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Fyfe J.C., Hemker S.L., Venta P.J., Stebbing B., and Giger U., 2014. Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption with Proteinuria (Imerslund-Gräsbeck Syndrome) in Juvenile Beagles. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 356-362.
- Geyer J., Döring B., Godoy J.R., Moritz A., Petzinger E., 2005. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 28, 95-99.
- Mizukami K., Shoubudani T., Nishimoto S., Kawamura R., Yabuki A., and Yamato O., 2012. Trapped Neutrophil Syndrome in a Border Collie Dog: Clinical, Clinico-Pathologic, and Molecular Findings. *J. Vet. Med. Sci.* 74(6): 797-800.


Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 20. června 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

  
prof. Ing. Miloš Soch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZENĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Budešská 1508, 370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 20. června 2016

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**

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., Ing. Kateřině Vernerové a Ing. et Ing. Boženě Hosnedlové, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích, Ivaně Čurnové za pomoc v praktické části a všem chovatelům za poskytnutí materiálu pro mou diplomovou práci.

## **Abstrakt**

Diplomová práce shrnuje poznatky o významných geneticky podmíněných chorobách vyskytujících se u border kolií. Je zde popsáno celkem 14 chorob, některé s doposud neznámou lokací kauzální mutace. Primárním zaměřením této práce byla g.4411956\_4411960delGTTT mutace genu *VPS13B* způsobující syndrom uvězněných neutrofilů (TNS), mutace AF045016.1: c.227\_230delATAG genu *MDR1* spojená s mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR1) a mutace c.8392delC genu *CUBN* která zapříčiňuje střevní malabsorpci kobalaminu neboli Imerslund-Gräsbeckův syndrom (IGS). Byl proveden rozbor genotypů u 89 border kolií s průkazem původu. DNA byla získána stěry bukální sliznice, izolace byla provedena z nativního materiálu Chelexem-100. Analýza probíhala optimalizovanou metodou PCR-RFLP za použití restričních enzymů *MboI* (MDR1) a *MslI* (IGS). Ve sledovaném vzorku byli zjištěni čtyři přenašeči g.4411956\_4411960delGTTT mutace zapříčiňující TNS. Pro MDR1 a IGS byly detekovány pouze nepostižení jedinci.

## **Klíčová slova**

Geneticky podmíněné choroby psů; syndrom uvězněných neutrofilů; mnohočetná léková rezistence; střevní malabsorbce kobalaminu; Imerslund-Gräsbeckův syndrom; border kolie

## **Abstract**

This diploma thesis summarizes knowledge of significant genetically conditioned diseases occurring in border collies. There is described a total of 14 diseases, some with the location of causal mutation not yet known. Primary focus of this thesis is g.4411956\_4411960delGTTT mutation of gene *VPS13B* causing Trapped Neutrophil Syndrome (TNS), *MDR1* gene's mutation AF045016.1: c.227\_230delATAG associated with multidrug resistance (MDR1) and *CUBN* gene's mutation c.8392delC which causes intestinal malabsorption of cobalamin by another name Imerslund–Gräsbeck syndrome (IGS). A genotype analysis of 89 border collies with a proof of origin was performed. The DNA was extracted from buccal mucosal swabs, the isolation of DNA was performed by Chelex-100 from the native material. The analysis was proceeded by optimized PCR-RFLP method using restrictive *MboI* (MDR1) and *Msl I* (IGS) enzymes. There were detected 4 g.4411956\_4411960delGTTT mutation vectors causing TNS. As for the MDR1 and IGS there wasn't detected any affected case.

## **Key words**

Genetically condition diseases of dogs; trapped neutrophil syndrome; multidrug resistance; intestinal malabsorption of cobalamin; Imerslund–Gräsbeck syndrome; border collie

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Úvod.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2. Cíl práce .....</b>                                  | <b>11</b> |
| <b>3. Border kolie .....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>4. Chov border kolie v ČR.....</b>                      | <b>14</b> |
| <b>5. Psí genom .....</b>                                  | <b>16</b> |
| <b>6. Významná dědičná onemocnění u border kolie .....</b> | <b>19</b> |
| 6.1 Syndrom uvězněných neutrofilů.....                     | 19        |
| 6.2 Imerslund-Gräsbeckův syndrom .....                     | 20        |
| 6.3 Mnohočetná léková rezistence .....                     | 22        |
| 6.4 Degenerativní myelopatie.....                          | 24        |
| 6.5 Pelger–Huětova anomálie.....                           | 25        |
| 6.6 Dentální hypomineralizace .....                        | 26        |
| 6.7 Anomálie oka kolií .....                               | 26        |
| 6.8 Idiopatická epilepsie.....                             | 27        |
| 6.9 Progresivní atrofie sítnice.....                       | 29        |
| 6.10 Neuronální ceroidní lipofuscinóza .....               | 30        |
| 6.11 Primární luxace čočky .....                           | 31        |
| 6.12 Primární glaukom .....                                | 31        |
| 6.13 Centronukleární myopatie .....                        | 32        |
| 6.14 Maligní hypertermie .....                             | 32        |
| <b>7. Materiál a metody .....</b>                          | <b>34</b> |
| 7.1 Materiál .....   | 34        |
| 7.2 Metody.....  | 34        |
| 7.2.1 Odběr vzorků .....                                   | 34        |
| 7.2.2 Izolace DNA .....                                    | 34        |
| 7.2.3 Polymerázová řetězová reakce.....                    | 35        |



|  |           |
|--|-----------|
| 7.2.4 Restrikční analýza.....                            | 38        |
| 7.2.5 Elektroforetická separace nukleových kyselin ..... | 39        |
| <b>8. Výsledky a diskuse .....</b>                       | <b>40</b> |
| <b>9. Závěr.....</b>                                     | <b>48</b> |
| <b>10. Zdroje použité literatury .....</b>               | <b>50</b> |
| <b>11. Seznam použitých tabulek.....</b>                 | <b>62</b> |
| <b>12. Seznam použitých obrázků .....</b>                | <b>63</b> |
| <b>13. Seznam použitých zkratk.....</b>                  | <b>64</b> |
| <b>14. Příloha .....</b>                                 | <b>66</b> |

## 1. Úvod

Výzkum problematiky geneticky podmíněných chorob u psů je významný v mnoha ohledech. Chov psů se stává celosvětovým trendem, a proto je důležité klást velký důraz nejen na exteriér, ale především na povahové vlastnosti a zdravotní stav chovných jedinců. Mnoho geneticky podmíněných onemocnění vzniklo právě v důsledku upřednostňování vzhledu psa před jeho zdravím. Často se tak setkáváme s mutacemi, jejichž nositelé mají jednoho společného předka, který byl v chovu často využíván díky exteriérovým kvalitám. Od jednoho jedince se tak daný defekt rozšířil do chovů po celém světě. Šíření dědičných onemocnění je také úzce spjato s popularitou plemene. V této problematice mají velký vliv chovatelské kluby, které prostřednictvím bonitačního řádu a dalších nařízení mohou účinně eliminovat šíření dědičných onemocnění v populaci.

Technologie moderní genetiky nám pomáhají determinovat genetické založení těchto nemocí a tím i umožňují jejich přesnou diagnostiku. Právě včasná diagnostika je klíčová pro zajištění kvalitního chovného základu plemene. Díky genetickým analýzám můžeme s jistotou ověřit kvalitu jednotlivých jedinců a jejich případný chovný potenciál. Velmi podstatným důvodem pro další výzkum dědičných onemocnění u zvířat obecně je také možnost jejich využití jako modelových onemocnění při léčbě obdobných lidských chorob.

Ačkoli jsou border kolie považovány za poměrně zdravé plemeno, jen v této práci je popsáno čtrnáct dědičně podmíněných chorob, pro které má toto plemeno predispozici. Podrobněji jsou zde analyzovány tři z nich: syndrom uvězněných neutrofilů, mnohočetná léková rezistence a Imerslund-Gräsbeckův syndrom. Pomocí polymerázové řetězové reakce a restriční analýzy byly vyhodnoceny genotypy příslušných genů u téměř stovky zástupců plemene.

## **2. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární přehled sumarizující dosavadní poznatky o geneticky podmíněných chorobách a analyzovat genotypy u souboru vzorků od jedinců plemene border kolie. Po izolaci DNA získané stěry bukální byla provedena analýza metodou PCR-RFLP. Byly vyhodnoceny jednotlivé genotypy příslušných genů a provedena analýza genetické struktury populace. Praktická část byla zaměřena na syndrom uvězněných neutrofilů, mnohočetnou lékovou rezistenci a Imerslund-Gräsbeckův syndrom.

### 3. Border kolie

Border kolie (BOC) je jedno z nejoblíbenějších psích plemen současnosti. Jeho vznik je datován do 15. a 16. století a je tedy spjat s počátkem chovu ovcí v Anglii (Morris 2004). Border kolie je výsledkem snachy chovatelů vyšlechtit odolného, inteligentního, rychlého, obratného a především dobře ovladatelného psa. BOC se proslavila díky soutěžím ovčáckých psů (poprvé v roce 1873), kde díky svým specifickým vlastnostem dodnes vyčnívá nad ostatní ovčácká plemena. Roku 1906 byla založena společnost ISDS (Internacional sheep dog society), ve které jsou evidováni jedinci plemene, kteří prokázali mimořádné pracovní schopnosti, na kterých je chov založen. Mimořádnými pracovními vlastnostmi BOC je myšlen specifický plíživý pohyb s nízko nesenou, dopředu vystrčenou hlavou (obr. 1) a oko fixující hnané zvíře (Morris 2004; BCCCCZ 2018). V novodobé historii plemene existuje několik odlišných linií, ze kterých postupně vznikla dnešní border kolie, která má být, stejně jako její předci, vytrvalým, výborně ovladatelným psem s vysokou inteligencí a bez známek agrese či nervozity. Stejně jako ISDS i FCI (Fédération Cynologique Internationale), kterou bylo plemeno uznáno roku 1988, lpí i chovných jedinců především na pracovních vlohách, povaze, mechanice pohybu a psychických vlastnostech. Exteriérové vlastnosti nejsou přísně hodnoceny, a proto se můžeme u BOC setkat s různými variantami vzhledy v závislosti na linii (obr 2; 3) Standard povoluje rozdíly v mohutnosti, kohoutkové výšce, nesení uší, typu a barvě srsti aj. (BCCCCZ 2018).



**Obr. 1: Plíživý pohyb s nízko nesenou hlavou typický pro plemeno (Michiyo-Fir 2011).**

Díky své inteligenci a ovladatelnosti se z BOC stalo asi nejrozšířenější psí plemeno, které je využíváno ve většině psích sportů. Důkazem vysoké inteligence plemene je test, kterému byla podrobena BOC Chaser. Ta se během tří let naučila rozeznávat 1022 objektů (pouze podle vyslovení podstatného jména věci), dané předměty kategorizovat a také odlišovat nové objekty mezi předměty pro psa již pojmenovanými (Pillely a Reid 2011).



**Obr. 2: Typ Herdman's Tommy (Autor neznámý 2016)**



**Obr. 3: Typ Nap (Autor neznámý 2016).**

## 4. Chov border kolie v ČR

První BOC zapsané v PK ČMKU (plemenná kniha českomoravské kynologické unie) byly dovezeny roky 1993 z Anglie. Byl to pes Caristan Jaguar (nar. 30. 7. 1992, č. zápisu v PK - CMKU/BOC/2/93/92/94) a fena Mobella Jackie (nar. 8. 4. 1992, č. zápisu v PK - CMKU/BOC/1/92/93/92/94). Po těchto dvou jedincích se v chovatelské stanici Bohemia Alké narodil první registrovaný vrh. Protože byl český chov postaven pouze na 7 importovaných psech a jejich vzájemných potomcích, roku 1997 se uskutečnilo první zahraniční krytí. Po založení BCC CZ v roce 1999 byly stanovené nové chovné podmínky, které zahrnovaly kromě výsledků výstav (pes 3x známka Výborně, fena 2x známka Výborně) také povinné veterinární vyšetření DKK, CEA, PRA a absolvování bonitace. Povinnost výstav pro uchovnění byla později zrušena (BCC CZ 2018). Z hlediska zdravotní stránky musí každý chovný jedinec splňovat tato kritéria:

- rentgenového vyšetření kyčelních kloubů na DKK vyhodnocené od klubem určeného veterináře (aktuálně MVDr. Jaromír Ekr a OFA), pořízeného u psa nebo feny ve věku minimálně 12 měsíců
- RTG vyšetření loketních kloubů na dysplazii (DLK) vyhodnocené od klubem určeného veterináře (aktuálně MVDr. Jaromír Ekr a OFA), pořízené ve věku minimálně 12 měsíců - povinnost tohoto vyšetření platí pro jedince rentgenované od 29. 9. 2013 včetně
- RTG vyšetření ramenních kloubů na osteochondritis dissecans vyhodnocené od klubem určeného veterináře (aktuálně MVDr. Jaromír Ekr a OFA), pořízené ve věku minimálně 12 měsíců - povinnost tohoto vyšetření platí pro jedince rentgenované od 29. 9. 2013 včetně
- kontrola očního pozadí na PRA a CEA, uskutečněná ve věku minimálně 12 měsíců, u psa ne starší než dva roky, u feny ne starší než tři roky
- negativní výsledek vyšetření očí na dědičné choroby a vady (vyšetření musí být aktualizováno až do věku sedmi let tak, aby v okamžiku plánovaného spojení nebylo starší u chovného psa více než dva roky a u feny tři roky; od dožitého sedmého roku věku zvířete až do ukončení chovnosti nesmí být vyšetření, shodně pro obě pohlaví, starší tří let; pro stanovení data je určující den vykonané kontroly, nikoli datum vystavení potvrzení o výsledku)

- nebudou spojeni jedinci, mezi jejichž potomky se vyskytla stejná dědičná choroba nebo vada
- nebude opakováno spojení dvou jedinců, u jejichž potomků se vyskytla dědičná choroba nebo vada
- nebudou spojeni dva jedinci zbarvení merle
- při krytí musí mít alespoň jeden z rodičů výsledek vyšetření DNA CEA normal, nebude-li tato podmínka splněna, krycí list pozbývá platnost a chovatel se vystavuje riziku nevystavení průkazů původu pro vrh z takového spojení
- při krytí musí mít alespoň jeden z rodičů výsledek vyšetření DNA TNS normal, nebude-li tato podmínka splněna, krycí list pozbývá platnost a chovatel se vystavuje riziku nevystavení průkazu původu pro vrh z takového spojení (toto ustanovení platí od 1.1.2012)
- výsledky vyšetření DNA CEA a DNA TNS se uznávají pouze z krve psa odebrané veterinářem, který zároveň potvrdí totožnost psa ověřením čipu nebo tetování (výsledky ze slin nebudou uznány, a to i když budou odebrány veterinářem)
- výsledek vyšetření DNA CEA a DNA TNS je požadován z certifikované laboratoře, a to již při žádosti o krycí list (stačí kopie certifikátu)
- výsledek vyšetření DNA CEA nebo DNA TNS z certifikované laboratoře nemusí mít pes nebo fena, pokud oba jeho rodiče nebo předci mají výsledek vyšetření DNA normal nebo DNA normal po rodičích a mají to potvrzeno certifikátem nebo zápisem v Průkazu původu Plemennou knihou (takovýto jedinec je pak DNA CEA normal po rodičích nebo DNA TNS normal po rodičích. Ve výjimečných případech - a to pouze, pokud je u předků zápis v oficiálních databázích - může potvrzení pro Plemennou knihu napsat Poradce chovu) (BCCCCZ 2018).

## 5. Psí genom

Pes domácí (*Canis familiaris*) je poměrně nedávno vzniklý druh z čeledi *Canidae*. Diverzifikoval se nejprve od nadčeledi *Canoidea*, zahrnující medvědy, skunky, mývaly, lasice, ale také tuleně, lachtany či mrože. Z této příbuznosti můžeme předpokládat, že psi budou s těmito taxony sdílet více molekulárních podobností než šelmy kočkovité, promykovité nebo hyenovité (Ostrander a Wayne 2016).

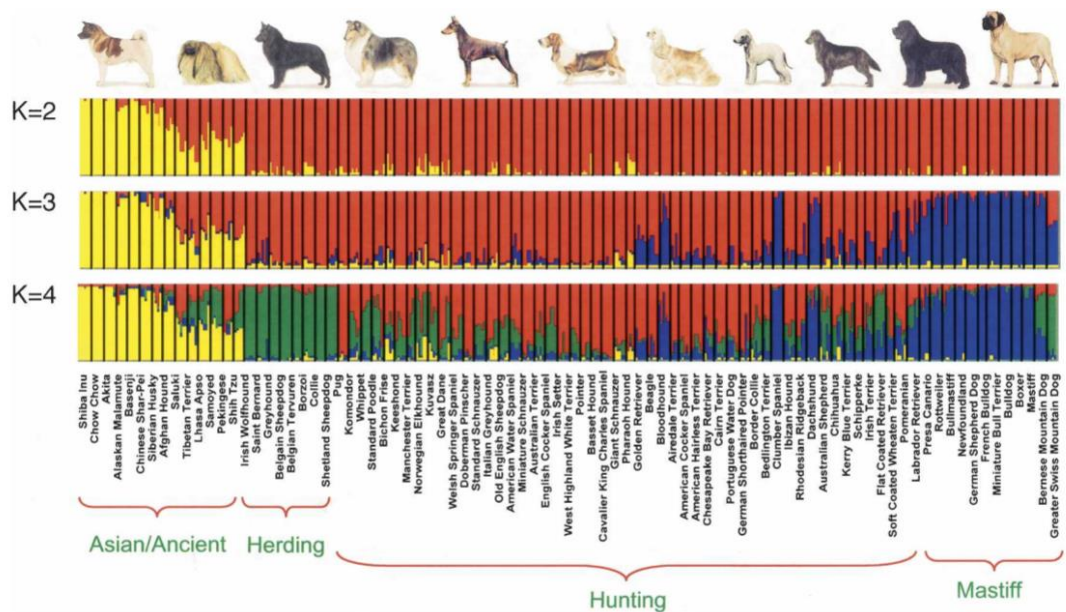
Studie provedené v nedávném období naznačují, že existující psovitě šelmy by mohly s touto nadčeledí sdílet retrotranspozony (konkrétně SINE elementy) a také rychle se vyvíjející geny pro čichové receptory, reprodukční proteiny či geny spojené s imunitou (Kirkness *et al.* 2003). I když má *Canis familiaris* chromozomální komplement v rozmezí od 36 do 78 chromozomů, všechny mohou být rekonstruovány pomocí jednoduchého chromozomálního přesmyku z rodového karyotypu. V rámci psovitých šelem byly určeny tři základní fylogenetické skupiny. První skupina zahrnuje rody *Vulpes* (liška šedorudá, liška horská, liška chama, liška kana, liška obecná, liška písečná, liška pouštní, liška šedohnědá a liška velkouchá) včetně, již v taxonomii nepoužívaných, rodů *Alopex* (liška polární, liška korsak) a *Fennecus* (fenek berberský). Do druhé skupiny řadíme rody *Canis* (šakal pruhovaný, šakal obecný a jeho poddruhy, šakal čabrákový, kojot, vlk obecný a jeho poddruhy, vlk rudohnědý, vlček etiopský, pravlk, pes Dingo), *Lycaon* (pes hyenovitý) a *Cuon* (dhoul). Rody zastupující skupinu třetí jsou *Lycalopex* (pes horský, pes Darwinův, pes argentinský, pes pampový, pes pouštní, pes šedý), *Cerdocyon* (maikong), *Alelocynus* (pes krátkouchý), *Atocyon* (pes ušatý), *Chrysocion* (pes hřivnatý) a rod *Spoetos* (pes pralesní). Kromě těchto tří skupin existují ještě rody *Nyctereutes* (psík mývalovitý) a *Urocyon* (liška šedá, liška ostrovní), u kterých není jasný fylogenetický původ a nelze je jednoznačně zařadit do jedné ze tří fylogenetických skupin psovitých šelem (Ostrander a Wayne 2016).

Rozsáhlé genetické analýzy psovitých šelem ukazují, že *Canis familiaris* byl odvozen pouze z vlků, což popírá teorii Charlese Darwina či Konrada Lorenze, kteří tvrdili, že psi sdílejí předky nejen s vlky, ale i s jinými psovitými šelmami, jako například s kojoty nebo šakali (Savolainen *et al.* 2002; (Ostrander a Wayne 2016). Fenotypová rozmanitost *Canis familiaris* tedy není způsobena velkým množstvím předků, ale v první řadě stojí na mutacích vlčí genetické informace, ke kterým došlo během krátké



historie psí domestikace (řádově se jedná o 105 mutací na genu za generaci). Pro získání těchto informací byla klíčová analýza mtDNA (mitochondriální DNA) jelikož mateřský mitochondriální genom je dědičný (Ostrander a Wayne 2016). Díky této analýze bylo prokázáno, že k fylogenetickému odlišení psa a vlka došlo asi před 40-135 tisíci lety, což se velmi odlišuje od dosavadního odhadu 15 000 let, který byl podložen nejstaršími archeologickými nálezy. Vývoj psa tedy zřejmě probíhal už v době, kdy nebyl s vlky fenotypově odlišný (Wayne *et al.* 2006).

Vznik obrovského množství psích plemen v posledních dvou stoletích je nejspíš jedním z největších genetických experimentů lidstva. Příkladem může být rozmanitost velikosti kostry, která je u psa domácího větší než u celé čeledi psovitých. Konkrétní genetické mechanismy této variability však zatím nejsou známy. Většina plemen psů má společné předky, což dokazuje shluková analýza 69 plemen, která byla rozdělena do pouhých čtyř klastřů (K), dle jejich nedávného společného vývoje (obr. 4) (Ostrander a Wayne 2016).

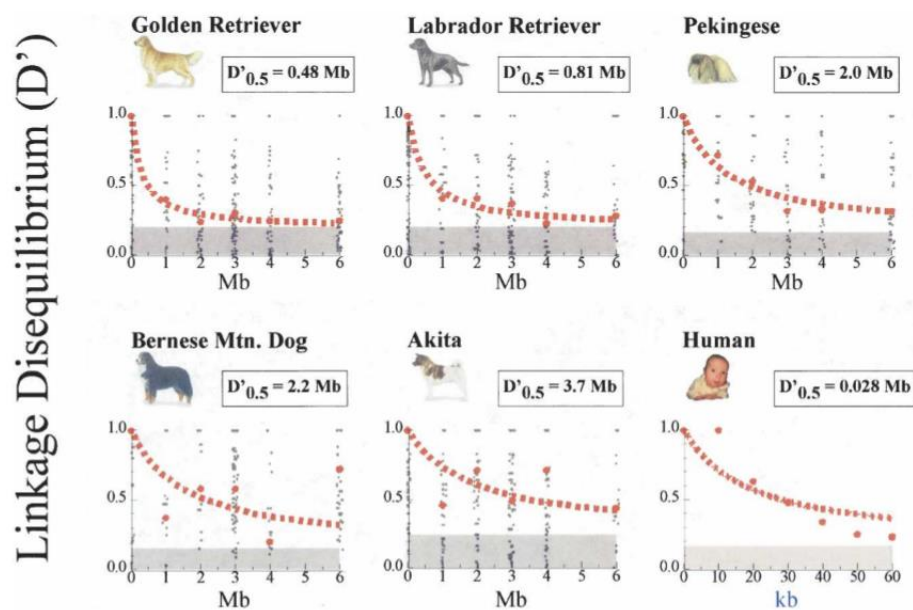


**Obr. 4: Rozdělení 69 plemen do 4 skupin na základě molekulární analýzy a analýzy genetické struktury (Ostrander a Wayne 2016).**

Dnes je na světě kolem 350 různých plemen psů. Přitom je však vznik a vývoj mnoha z nich postaven pouze na několika konkrétních jedincích, kteří byli do chovu vybráni jako nejlepší zástupci daného plemene. Tyto šlechtitelské postupy z velké části snižují efektivní velikost populace a zároveň zvyšují genetický drift, vedoucí ke ztrátě genetické rozmanitosti v rámci jednotlivých plemen a divergenci frekvence alel

(Sutter a Ostrander 2004). Parker *et al.* (2017) uvádí, že ačkoli mají lidé a psi celkovou nukleotidovou diverzitu na podobné úrovni, stupeň genetické homogenity je v rámci jednotlivých plemen psů větší, než u lidské populace (Ostrander a Wayne 2016).

Ačkoli je psí vazebná nerovnováha (LD) přibližně 20 - 50krát širší než lidské (0,028 Mb), je možné psí genom využít při mapování společných a komplexních onemocnění, jako je epilepsie, autoimunitní onemocnění, hluchota a další. Je ovšem důležité vybrat vhodné plemeno, jelikož bylo prokázáno, že psí genom má vysoké úrovně LD lišící se v závislosti na plemeni (např. zlatý retrívr 0,48 Mb, labradorský retrívr 0,9 Mb, bernský salašnický pes 2,2 Mb; obr. 5) (Ostrander a Wayne 2016).



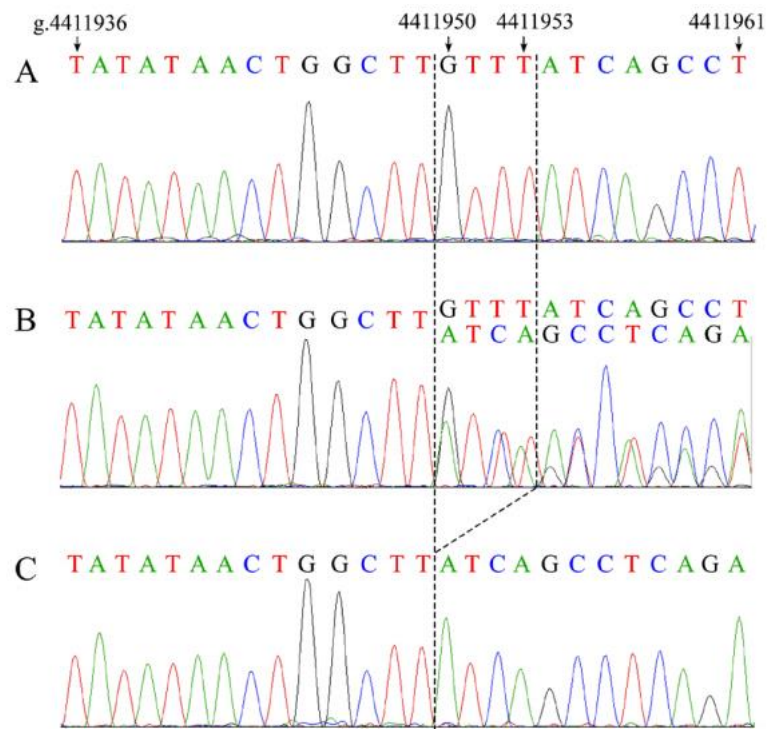
Obr. 5: Úrovně LD u vybraných plemen psů (Mb) v porovnání s lidskou LD (kb) (Ostrander a Wayne 2016).

## 6. Významná dědičná onemocnění u border kolie

### 6.1 Syndrom uvězněných neutrofilů

TNS (trapped neutrophil syndrome) byl poprvé popsán v Austrálii v 90. letech 20. století, v téže zemi vlivem inbreedingu onemocnění také vzniklo (Mizukami *et al.* 2012). Tato primární imunodeficience způsobuje, že u postižených psů nedochází k uvolňování neutrofilů do krve a nemohou se tak podílet na likvidaci bakteriálních infekcí a díky exkreci cytokininů aktivovat ostatní složky imunitního systému (Mason *et al.* 2014; Day 2011). Tím dojde k jeho pomalému selhávání, které se začne projevovat u štěňat ve věku již dvou týdnů. Prvotními příznaky jsou nechutenství, apatie, špatná pohyblivost. Další průběh závisí na druhu infekce, která daného jedince postihne. Spolehlivé určení tohoto syndromu je možné pouze pomocí laboratorní diagnostiky (Mason *et al.* 2014).

TNS je autozomálně recesivní neutropenie způsobená kauzativní mutací genu *VPS13B* v exonu 19. Tako čtyřpárová delece (g.4411950\_4411953delGTTT) způsobuje chybné kódování transmembránového proteinu (Gans 2015; obr. 6).



Obr. 6: Sekvence aminokyselin pro *VPS13B*. Znázornění posloupnosti bází u zdravého jedince (A), přenašeče (B) a psa postiženého TNS (C) (Mizukami 2012).

Frekvence mutované alely byla v populaci BOC stanovena na průměrných 0,064 a v chovu je tedy v současnosti velké množství přenašečů (Shearman a Wilton 2011). Všichni přenašeči mají společného jednoho předka pocházejícího právě z Austrálie, který byl díky kvalitnímu exteriéru často využíván v chovu. Největší procentuální zastoupení přenašečů TNS v chovech má USA (16,5 %), Austrálie (15,4 %), Finsko (13,0 %) a Německo (12,9 %) (Mizukami *et al.* 2012). Štěňata s tímto syndromem ve většině případů zemřou nebo jsou utracena ve stáří přibližně 4 měsíce. Doposud bylo zaznamenáno pouze několik případů, kdy se postižení jedinci dožili díky imunomodulační terapii vyššího věku (maximálně 6 let) (Wouda *et al.* 2010). Syndrom uvězněných netrofilů byl opakovaně využit jako modelové onemocnění pro Cohenův syndrom (Shearman a Wilton 2011).

## 6.2 Imerslund-Gräsbeckův syndrom

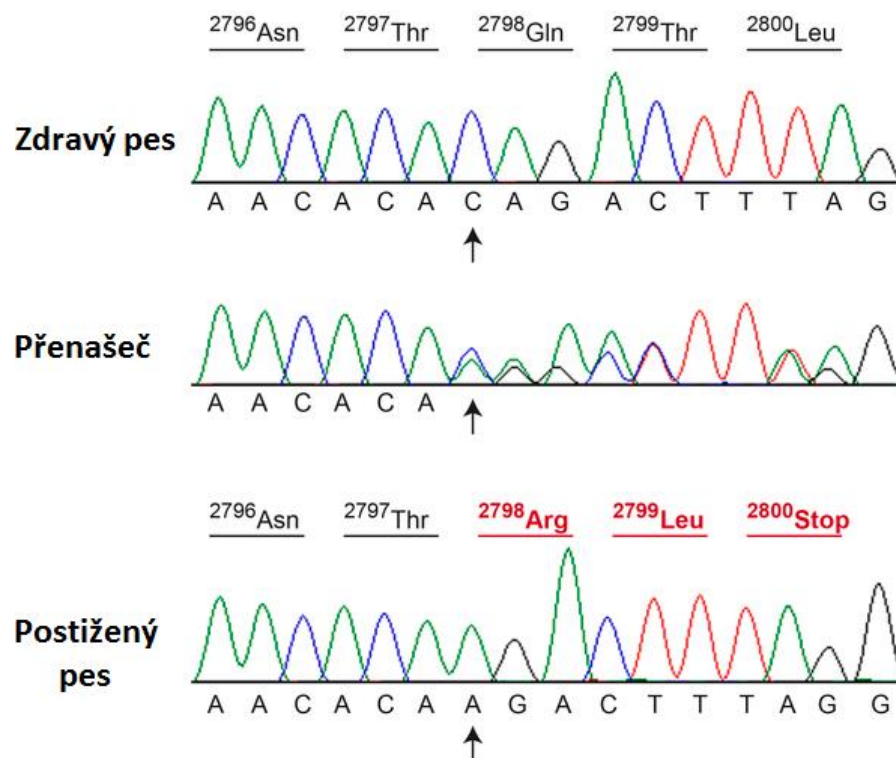
Imerslund-Gräsbeck syndrom (IGS), nazývaný také jako střevní malabsorpce kobalaminu (Cbl), je autosomálně recesivní onemocnění popsané kromě zvířat také u lidí (Owczarek-Lipska *et al.* 2013). Jedná se o metabolickou poruchu projevující se neutropenií, neregenerativní anémií a snížením sérového Cbl. Dalšími příznaky jsou chronické nechutenství, methylmalonová acidurie, homocysteinémie a megaloblastické změny kostní dřeně. Dané projevy mohou být způsobeny mutací genu *CUBN* nebo *AMN* (Fyfe *et al.* 2014). Proteiny amnionless (*AMN*) a cubilin (*CUBN*) dohromady tvoří transmembránový proteinový komplex, tzv. cubam. Jde o receptor nezbytný pro využití Cbl z lumen střev (Drögemüller *et al.* 2014). Mutace genu *CUBN* postihuje BOC a bigla, u australského ovčáka a velkého knírače byly zjištěny dvě různé mutace genu *AMN* (He *et al.* 2003). U plemene shar pei prozatím nebyl určen kauzální gen podléhající mutaci (Bishop *et al.* 2012).

Cbl neboli vitamín B12, je ve vodě rozpustná látka, nezbytná pro přenos methylových zbytků při syntéze thymínu a tudíž i pro syntézu DNA. Účastní se krvetvorby, činnosti nervového systému a také metabolismu homocysteinu a methioninu (Lutz *et al.* 2013). Vyšší organismy Cbl přijímají v potravě, nebo díky syntéze symbiotických mikroorganismů. Resorpce Cbl z potravy a jeho transport k cílovým buňkám je složitý proces, pro který existuje více dědičných poruch. U zdravých psů se Cbl z potravy váže na glykoprotein, tvořený sliznicí žaludku a epitelem vývodu pankreatu. Komplex

vnitřního faktoru a Cbl je absorbován prostřednictvím receptorů enterocytů v distálním jejunu a ileu. Absence těchto receptorů tedy způsobuje příznaky malabsorpce kobalaminu (Owczarek-Lipska *et al.* 2013).

Jako hlavní příčinou IGS u BOC byla identifikována mutace c.8392delC genu *CUBN*. Tato delece vytvoří předčasný stop kodon (p.Q2798Rfs \* 3) a předpokládá se, že vede ke kompletní ztrátě funkce alely (obr. 7) (Owczarek-Lipska *et al.* 2013; Fyfe *et al.* 2013). Ve skupině evropských kolií činí prevalence mutace genu *CUBN* 6 % (Owczarek-Lipska *et al.* 2013).

První projevy klinických příznaků IGS se začínají objevovat kolem 6 až 12 týdnů věku, do té doby mají psi rezervu Cbl v játrech. Ačkoli mají postižení jedinci normální funkci ledvin, močí jsou vylučovány proteiny s nízkou molekulovou hmotností (Owczarek-Lipska *et al.* 2013).



Obr. 7.: Elektroferogram zdravého psa, přenašeče a psa postiženého mutací genu *CUBN*. Změněné kodony jsou znázorněny červeně, výsledkem delece je předčasný stop kodon (p.Q2798Rfs \* 3) (Owczarek-Lipska *et al.* 2013).

### 6.3 Mnohočetná léková rezistence

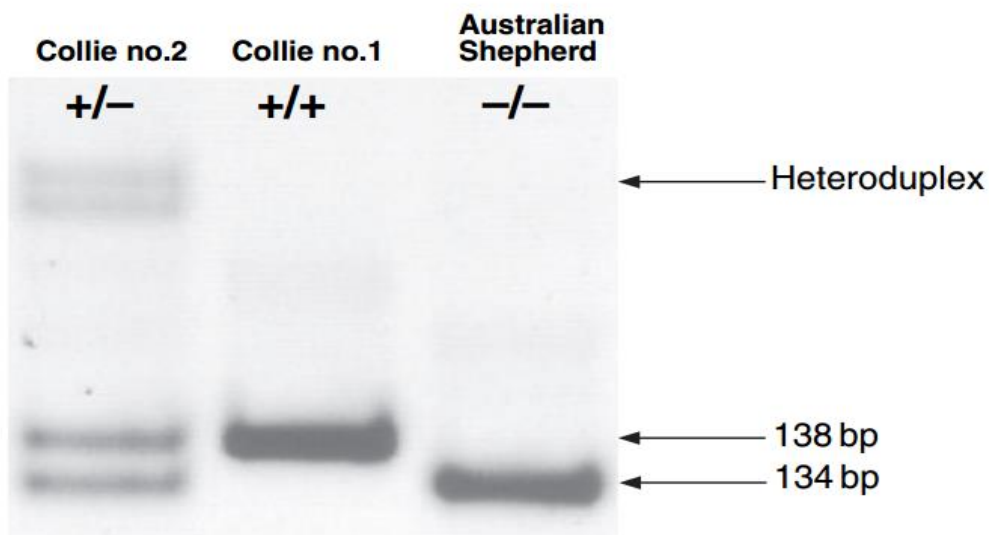
Mutace genu *MDR1* (multidrug resistance gene) je spojována s vícenásobnou citlivostí psů na několik konkrétních látek v běžně užívaných léčivech (Baars *et al.* 2007). Prozatím byla tato mutace detekována u více jak 10 plemen psů, včetně jejich kříženců. Každé z plemen má odlišnou frekvenci mutované alely. S výjimkou dlouhosrstého whipeta se tato mutace vyskytuje výhradně u ovčáckých plemen psů, s největší frekvencí u kolie (59 %), šeltie (30 %) a miniaturního australského ovčáka (24 %) (Gramer *et al.* 2010).<sup>1</sup> I přesto, že u border kolie je frekvence mutované alely pouze 1%, jedná se o chovateli stále častěji testovanou mutaci. Test *MDR1* není nutný k uchovnění psa (Gramer *et al.* 2010; BCC CZ 2018). Mutace byla poprvé rozpoznána u kolí v roce 1980 a to v souvislosti s přecitlivělostí psů na ivermectin (Mealey *et al.* 2005).

*MDR1* je kódujícím genem pro P-glykoprotein (Pgp). Při výzkumu, zabývajícím se tímto genem, byla u afektovaných psů zjištěna ve 4. exonu homozygotní delece čtyř párů bází (obr. 8), označena jako *mdr1-1D*, *ABCB1-1D*, nebo *MDR1 nt230 (del4)*. Pokud k této mutaci dojde, předčasný stop-kodon ukončí syntézu Pgp již v přibližně 10 % sekvenci aminokyselin zdravé alely a protein tak ztrácí svou funkci. (Gramer *et al.* 2010).

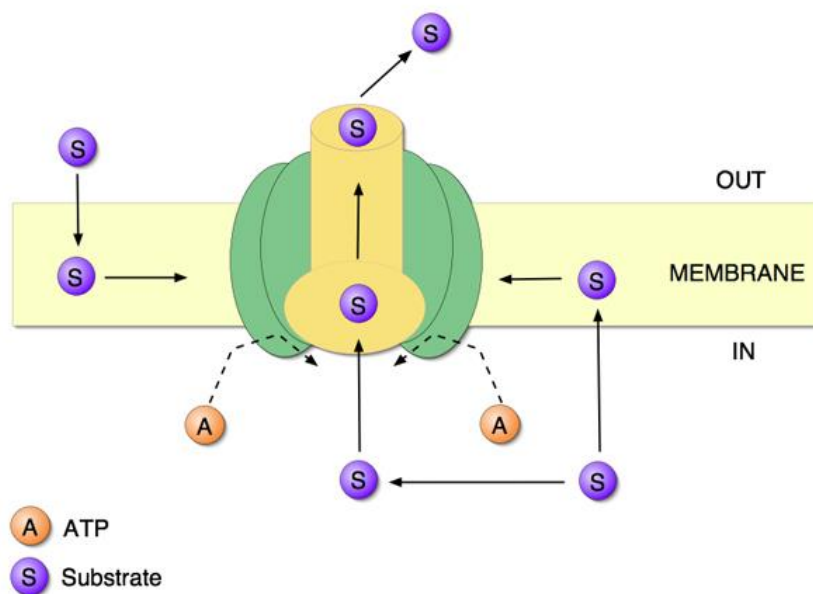
Pgp má významný dopad na distribuci léčiv, chrání tkáň před hromaděním cizorodých látek a také odpovídá za zpětnou odpověď organismu na daný lék. Tento protein je exprimován v mnoha tkáních s vylučovací nebo sekreční funkcí (játra, ledviny, střeva), kde omezuje absorpci léčiva a podporuje jeho vylučování do žluči a moči (obr. 9). Vysoký podíl Pgp je také v hematoencefalické bariéře, kde omezuje vstup léku do centrální nervové soustavy (Gramer *et al.* 2010; Edwards 2008).

---

<sup>1</sup> Frekvence mutované alely u ostatních plemen: dlouhosrstý whipet – 45 %, australský ovčák – 22 %, wäller – 17 %, bílý švýcarský ovčák – 14 %, bobtail – 4 %.



Obr. 8: Detekce delece genu *MDR1*. Kolie 2 - heterozygot s jednou mutovanou alelou, kolie 1 – homozygot se dvěma zdravími alelami a australský ovčák – homozygot se dvěma mutovanými alelami (Geyer et al. 2005).



Obr. 9: Zjednodušené schéma funkce Pgp. Molekula Pgp překlenuje buněčnou membránu, takže je v kontaktu také s vnitřní a vnější stranou buňky. Centrální část molekuly tvoří kanál, jehož prostřednictvím jsou toxické chemické látky čerpány zpět do okolního prostředí. Pumpování umožňuje ATP (Edwards 2008).

Rizikové látky, na které mohou postižení jedinci špatně reagovat, mohou obsahovat antibiotika, antiparazitika, protirakovinné léky, antiepileptika či analgetika. Z konkrétních látek je to například ivermectin, butorphanol, moxidecin nebo selamectin, které jsou při léčbě psů běžně využívány. Celkový počet těchto rizikových látek zatím nebyl určen. Diagnostika se provádí pomocí testů DNA, která může být získána z krve nebo stěrem slin z bukální sliznice psa. (Gramer *et al.* 2010; Geyer *et al.* 2005). Český chovatelský klub border kolií uznává pouze test DNA získané z krve a zhotovený renomovanou laboratoří (BCCCZ 2018).

## 6.4 Degenerativní myelopatie

Degenerativní myelopatie (DM; degenerative myelopathy) je progresivní neurogenerativní onemocnění, které se vyskytuje u více jak stovky psích plemen (německý ovčák, bernský salašnický pes, boxer aj.), se stejnou frekvencí u obou pohlaví (Zeng *et al.* 2014). Prvotní klinické příznaky se u postižených psů objevují nejdříve v osmém roku věku a zahrnují postupné nebolestivé slábnutí pánevních končetin a problémy s chůzí a koordinací pohybu (Kohyama *et al.* 2017; Shelton *et al.* 2012). Během tří až pěti let přejdou primární příznaky v ataxii a atrofii svalstva, po které následuje úplné ochrnutí zadních končetin. Klíčovým znakem degenerativní myelopatie je paraspinální hyperestézie, vedoucí k dušnosti a paraplegii (Kohyama *et al.* 2017; Wiley 2011).

Příčinou DM je ve většině případů mutace genu superoxidismutáze 1 (*SOD1*). Byly identifikovány dvě asociované mutace: c.118G > A (p.E40K) a c.52A>T (p.S18T), které způsobují hromadění proteinů do nerozpustných agregátů (Kohyama *et al.* 2017). Záměna nukleotidu A za nukleotid T byla detekována pouze u bernského salašnického psa, mutace c.118G > A je široce distribuována mezi 124 plemeny (včetně BSP) (Kohyama *et al.* 2017; Pfahler *et al.* 2013). Hystopatologie míchy postižených psů ukazuje podobný vzorec pro lipoprotein myelin a reaktivní astrogliózu jako u lidské amyotrofické laterální sklerózy, onemocnění motorických neuronů, které taktéž způsobuje mutace v superoxidismutáze 1 (Katz *et al.* 2017; Nardone *et al.* 2016; Crisp *et al.* 2014).



DM je autosomálně recesivním onemocněním, projevuje se tedy u recesivních homozygotů (Toedebusch *et al.* 2017). Pfahler *et al.* (2013) uvádí zjištění SOD1 agregátů antigenů v c.118G > A u heterozygotních jedinců, jde však pouze o malou frekvenci výskytu.

## 6.5 Pelger–Huětova anomálie

Pelger–Huětova anomálie (PHA; Pelger–Huët anomaly) byla poprvé popsána roku 1965 u zástupce plemene Redbone Coonhound (Latimer *et al.* 2000). Tato anomálie způsobuje poruchu maturace myeloidních buněk, převážně monocytů a granulocytů. Porucha spočívá v hypolobulaci buněčných jader. Mezi zdravými psy a psy postiženými PHA nebyl prokázán významný rozdíl v chemotaxi, fagocytóze, přilnavosti neutrofilů ani v obranyschopnosti organismu proti stafylokokům. Jelikož B i T lymfocyty spolupracují s imunitním systémem v dostatečné míře, psi s PHA nejeví větší náchylnosti k infekcím. V homozygotní formě je PHA letální již v prenatalním vývoji (Šimerdová *et al.* 2014; Faria *et al.* 2012; Latimer *et al.* 1989).

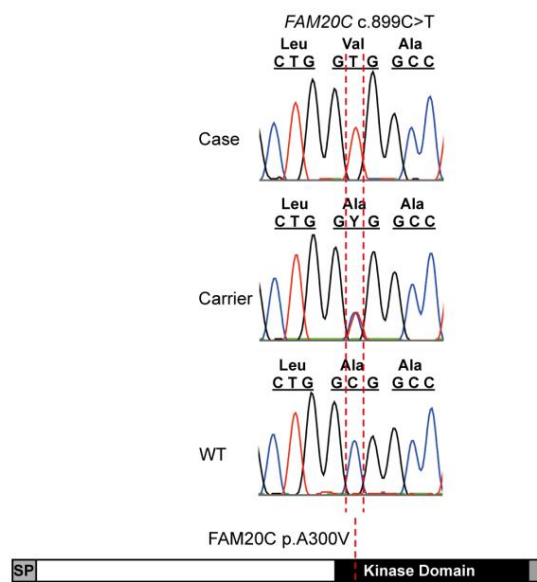
PHA se vyskytuje v kongenitální a získané formě. Vznik získané neboli pseudo-PHA formy závisí na jiných onemocněních nebo podávání některých druhů léčiv. Místo mutace vrozené formy nebylo u psů doposud zjištěno. Jedná se autozomálně dominantně dědičné onemocnění, pro které má predispozice více plemen psů. Nejčastěji je spojována s australským ovčákem (v USA zjištěna u 9,8 % AO), u kterého se odlišuje neúplnou penetrací – mutovaná alela se tedy projeví ve fenotypu menšího počtu jedinců (Latimer *et al.* 2000). Mezi další plemena, u kterých byla PHA popsána, patří kromě BOC také australský honácký pes, samojed, německý ovčák, basenji, kokršpaněl, bostonský teriér, americký foxhound, dánsko-švédský farmářský pes a v malé míře také u jejich kříženců (Šimerdová *et al.* 2014; Lukaszewska *et al.* 2011; Vale 2011; Latimer *et al.* 2000).

Vzhledem k neznámé lokaci mutace nemůžeme být PHA zjištěno pomocí DNA testů. Diagnóza se provádí zjišťováním hyposegmentace granulocytů pomocí opakovaných cytologických vyšetření krevních nátěrů. Jelikož se abnormalita vzhledu leukocytů vyskytuje i v případech leukémie či vážnějších zánětů, je s nimi PHA často zaměňována (Šimerdová *et al.* 2014). Dle Latimera *et al.* (2000) lze PHA s přesností určit kondenzovaným chromatinem při jednorázovém nálezu.

## 6.6 Dentální hypomineralizace

Dentální hypomineralizace (RS; Raine syndrome) charakterizuje nedostatečná mineralizace zubů během zubního vývoje, což vede k abnormálnímu opotřebenosti zubů, pulpitidě, praskání zubní skloviny nebo k zbarvení zubů (White *et al.* 2017; Boy *et al.* 2016; Hytönen a Hannes 2016). Takto vážné opotřebenosti způsobuje chronické záněty, díky kterým může dojít k úplné ztrátě zubů. Predispozice pro dentální hypomineralizaci byla prokázána pouze u BOC. Hytönen *et al.* (2016) uvádí frekvenci této mutace v populaci na 11 %, jde tedy o relativně běžný defekt.

RS je autozomálně recesivní onemocnění vznikající bodovou mutací c.899C > T genu pro FAM20C protein. Tento protein fosforyluje proteiny zapojené do mineralizace zubů a váže vápník (Hytönen *et al.* 2016; Simpson *et al.* 2007; obr. 10).



Obr. 10: Genomové sekvenování tří border kolí v souvislosti s dentální hypomineralizací. WT – zdravý jedinec, Carrier – přenašeč a Case jedinec postižený mutací FAM20C c.899C> T (p.A300V).

## 6.7 Anomálie oka kolí

CEA (Collie Eye Anomaly) byla poprvé popsána roku 1953 v USA. Kromě BOC postihuje také australské ovčáky, šeltie, krátkosrsté i dlouhosrsté kolie (Palánová 2015). Jedná se o vývojové oční onemocnění, jehož průběh začíná přibližně

ve 30. dni embryonálního vývoje. V různé intenzitě způsobuje morfologické postižení zadní stěny očního bulbu, což je zapříčiněno narušením syntézy bílkovin vlivem indukce abnormálního enzymu. Onemocnění se vyskytuje ve střední a těžké formě (Paldusová 2011).

Pokud dojde k poškození mezodermu, jedná se o střední formu. Ta je patrná ve věky mezi 5-8 týdny a způsobuje hypopasii cévnatky. Dochází zde ke špatnému vývoji krevních kapilár a je možný úbytek pigmentu v cévnatce. U štěňat je důležité provádět vyšetření před 3. měsícem věku, po úplném dobarvení sítnice je totiž tento projev často skryt novým pigmentem. Psi se střední formou CEA většinou nejsou ohroženi totální slepotou. Pokud během embryonálního vývoje dojde k poškození ektodermu, hovoříme o těžké formě CEA. Dochází zde k nenávratnému poškození cév cévnatky, odchlípení sítnice, v některých případech i k masivnímu nitroočnímu krvácení. Často také bývá poškozen optický nerv. U 5–10 % psů s těžkou formou CEA dojde k úplnému oslepnutí (Knickelbein *et al.* 2018; Palánová 2015; Mellersh 2014).

CEA je autozomálně recesivní onemocnění způsobené homozygotní delecí 7799 bp v genu *NHEJ1* chromozomu 37 (Mizukami *et al.* 2014). CEA se častěji vyskytuje u blue merle jedinců, dá se tedy předpokládat vazba CEA na vlohu barvy. K diagnostice je využíváno oftalmologické vyšetření (Palánová 2015).

## 6.8 Idiopatická epilepsie

Idiopatická epilepsie (IE) se u psů vyskytuje s odhadovanou prevalencí 0,62 % a je tedy jednou z nejběžnějších chronických neurologických chorob (Rusbridge 2016). Záchvaty jsou způsobeny abnormální elektrickou aktivitou určitých neuronů, kterou může podněcovat např. zasažení aktivních buněk infekcí, přítomnost odpadních látek v mozku způsobená jejich nahromaděním v krevním řečišti nebo momentální disfunkce. Nejčastějším typem záchvatu u psů je tzv. grand mal, který se vyznačuje ztuhnutím končetin následované jejich trhavými pohyby. Po záchvatu je pes dezorientovaný a jeho pohyby jsou nekoordinované. Mohou se také vyskytnout neurologické abnormality, jako je slepota či hluchota. Záchvat obvykle trvá okolo 95 vteřin. Pro IE je charakteristická vazba jednotlivých typů na konkrétní věk (Volná 2016; Hüsmeyer *et al.* 2010).

Pokud je u psa diagnostikována idiopatická epilepsie, léčba je doživotní. Ve většině případů se podaří pouze minimalizovat příznaky, antiepileptika využívaná ve veterinární medicíně nemají takovou účinnost jako antiepileptika lidská. Doživotní eliminace epileptických záchvatů se podaří u 20 % psů. Za úspěšnou léčbu je považováno snížení četnosti záchvatových dnů na méně než 5 dní v roce. Nejčastějšími tlumícími medikamenty je bromid draselný a fenolbarbital (Volná 2016).

IE mají genetický původ, zodpovědný molekulárně-genetický defekt byl však zatím nalezen jen pro některé z nich. Seppälä *et al.* (2011) uvádí kauzální mutaci c.1552A > T v genu *LGI2* způsobující juvenilní epilepsii pro plemeno romaňolského vodního psa. Epilepsie je nejvíce spojována s genem *ABCBI*, který kóduje transmembránový protein ATP. Mutace c.-6-180T > G tohoto genu má potenciaálně největší souvislost s výskytem IE. U kolí je známá delece (c.296\_299del) v exonu 4 genu *ABCBI*, která v homozygotní formě způsobuje disfunkci glykoproteinu a závažné neurobiologické obtíže (Alves *et al.* 2011).

Jelikož ve většině případů neznáme kauzální mutaci způsobující IE, diagnostika probíhá vylučovací metodou. Kromě sledování průběhu příznaků je nutné provádět doplňková vyšetření jako je EEG, rozbor moči, krve a mozkomíšního moku. Testuje se také správná funkce ledvin, jater a slinivky (Volná 2016). Analýzu DNA je možné použít u miniaturního drsnorstého jezevčíka (Laforaova choroba), stafordširský bulteriér (L2-hydroxyglutarová acidurie) a výše zmíněného romaňolského vodního psa (juvenilní epilepsie) (Rusbridge 2016; Alves *et al.* 2011; Hüsmeyer *et al.* 2010).

Mezi plemena s predispozicí pro IE patří především kolie (dlouhosrstá, krátkosrstá, bearded, border) bígl, zlatý retrívr, labradorský retrívr, německý ovčák a pudl (Volná 2016).

Roku 2011 vznikla v České republice databáze border kolí s příznaky epilepsie, několik podobných databází existuje i v jiných zemích. Podmínkou zařazení psa do databáze není potvrzená veterinární diagnóza a proto se u všech zaregistrovaných jedinců nemusí jednat idiopatickou formu epilepsie (BCCCZ 2018).

## 6.9 Progresivní atrofie sítnice

Progresivní retinální atrofie (PRA; progressive retinal atrophy) byla poprvé popsána u gordonsetrů roku 1911 (Maehara *et al.* 2015). Při PRA dochází k degradaci světločivných buněk sítnice z důvodu nedostatečného cévního zásobení a postižený jedinec tak postupně ztrácí zrak. První příznaky se projevují kolem třetího roku života. Existuje několik forem PRA které se vyskytují u více než 100 plemen psů. Tyto formy jsou geneticky vysoce heterogenní s několika způsoby přenosu, zahrnující velké množství genů a mutací. Každá PRA se obecně vyskytuje pouze u jednoho nebo několika plemen. Výjimkou je forma PRA-prcd (progressive rod cone degeneration) neboli progresivní degenerace tyčinek a čípků, která postihuje na 20 psích plemen (Vilboux *et al.* 2008). Dalšími formami jsou dysplazie tyčinek a čípků (rcd1, rcd2, rcd3), raná degenerace sítnice (erd) dysplazie tyčinek (rd), dysplazie fotoreceptorů (pd) a PRA dědičně vázaná na samičí pohlaví (XL PRA) (Downs *et al.* 2012; Vilboux *et al.* 2008; Dekomien *et al.* 2000; Lightfoot *et al.* 1996). Právě tato forma se pravděpodobně vyskytuje také u border kolií. XL PRA a prcd jsou formy vzniklé díky mutaci již vytvořených buněk, rcd1, 2 a 3, erd, rd a pd jsou formy vzniklé při diferenciaci buněk v prenatálním období. PRA je obecně spojována s autozomálně recesivní dědičností (BCCCZ 2018).

S BOC je spojována také centrální PRA (CPRA; retinal pigment epithelial dystrophy). Ta se objevuje již mezi prvním a druhým rokem života. Postižení jedinci ztrácí zrak ve středu zorného pole, periferní vidění však bývá zachováno a nedochází tedy k úplné ztrátě zraku (Acland 2002). U BOC se předpokládá polygenní dědičnost nebo autozomálně dominantní dědičnost s neúplnou penetrací. Mezi lety 1965 až 1985 se v UK počet pozitivních CPRA jedinců snížil na jednu šestinu (2 %), v současnosti se tedy jedná spíše o vzácnou formu PRA (BCCCZ 2018).

V ČR byl u BOC zaznamenán pouze jeden případ podezření na PRA. Jelikož zatím neznáme genetickou podstatu tohoto onemocnění diagnostika je prováděna pouze oftalmologickým vyšetřením, které je v případě uchovnění psů povinné (BCCCZ 2018).

## 6.10 Neuronální ceroidní lipofuscinóza

Jedná se o autosomálně recesivní, neurodegenerativní onemocnění postihující kromě psů a lidí také kočky, skot, kachny, fretky, kozy, koně, opice, papoušky, a prasata (Gilliam *et al.* 2015). Prozatím byla neuronální ceroidní lipofuscinóza (NCL) spojena s mutacemi sedmi různých genů (*CLNs 1, 2, 5, 6, 8, 10, 12*), přičemž každá mutace daného genu způsobuje jedinečnou formu NCL. U jednotlivých plemen se konkrétní forma mutace obtížně určuje (Guo *et al.* 2015). První diagnostikované případy NCL u BOC byly zaznamenány v Austrálii v 80. letech 19. století, kdy bylo u 23 jedinců detekován výskyt podobných symptomů. Ojedinělý případ byl zaznamenán také v USA o deset let později (Trýznová 2014).

NCL je podmíněno mutací v pozici 619 kódující sekvence exonu 4 *CLN5*. Tato jednobodová substituce (c.619C > T) vede k vytvoření předčasného stop kodonu v pozici 206 *CLN5* proteinu a výsledný protein je tak zkrácen o 144 aminokyselin (Kolicheski *et al.* 2016). Mezi plemena, u kterých je znám kauzální gen, patří kromě BOC také anglický setr, jezevčík, australský ovčák, čínský chocholatý pes, americký buldog, tibetský teriér, zlatý retrívr, čivava a čau čau (Faller *et al.* 2016; Kolicheski *et al.* 2016; Gilliam *et al.* 2015).

Pro NCL je charakteristické shromažďování lipopigmentů lipofuscinu a ceroinu v lysozomech. Klinický průběh choroby je značně individuální, u BOC je možné první příznaky pozorovat už kolem 15 měsíce života a stupeň neurodegradace se s věkem psa zvyšuje. U postiženého jedince dochází k ataxii a rozvinutí psychických abnormalit jako např. zvyšující se agrese, neklid, hyperaktivita, halucinace či epileptické záchvaty (Gilliam *et al.* 2015). Většina postižených jedinců ztrácí schopnost svalové koordinace při základních činnostech jako je krmení nebo chůze. Ukládání lipopigmentů může také způsobit poškození sítnice. U BOC se postižení jedinci zřídka dožívají více než 28 měsíců (Melville *et al.* 2005).

## 6.11 Primární luxace čočky

PPL (primary lens luxation) postihuje mnoho psích plemen, a to zejména teriéry. Přestože byla tato oční vada poprvé popsána Grayem *et al.* již v roce 1932, mutaci spojenou s PPL zatím známe jen pro některá plemena (Jack Russel terier, Parson Russel teriér, Patterdale teriér, miniaturní bulteriér, australský honácký pes aj.) (Gould *et al.* 2011; Farias *et al.* 2010).

Princip této vady spočívá v nedokonalém vývoji závěsného aparátu, které fixují čočku. Při jejich poškození dojde k dislokaci čočky (může nastat i následkem úrazu. Uvolnění vláken způsobí posunutí čočky do přední nebo zadní komory. Vznikne tak zákal, který vede k úplné ztrátě zraku. PPL vždy zasáhne obě oči (Gould *et al.* 2011).

V současnosti je za příčinu považována mutace v genu *ADAMT17* psiho chromozomu 3 (CFA3). Pomocí genetických testů je možné určit přítomnost této nestříhové mutace, není však možné těmito testy vyloučit jiné formy PPL či odhalit propuknutí choroby u případných přenašečů. Je předpokládána autosomálně recesivní dědičnost (Farias *et al.* 2010).

Frekvence mutované alely ani kauzální mutace nejsou pro BOC známy.

## 6.12 Primární glaukom

Další dědičnou oční vadou vyskytující se u border kolií je primární glaukom (PG; primary glaucoma). Jedná se o rozmanitou skupinu onemocnění vedoucí k oslepnutí, které způsobuje ztráta retinálních gangliových buněk a poškození zrakového nervu (Bouhenni *et al.* 2012; Bedford 1975). PG dělíme podle tzv. iridokorneálního úhlu (úhel mezi rohovkou a duhovkou) na primární glaukom s otevřeným úhlem (POAG), primární glaukom s uzavřeným úhlem (PACG) a primární kongenitální glaukom (PCG). U border kolií se nejčastěji vyskytuje PACG, pro který neznáme kauzální mutaci a v současnosti tedy neexistuje genetický test. Diagnostika se provádí goniskopicky. PG byl u border kolií objeven poměrně nedávno, frekvence mutované alely není známa (BCCCZ 2017; Oliver *et al.* 2015; Bouhenni *et al.* 2012).

### 6.13 Centronukleární myopatie

Centronukleární myopatie (CMN; centronuclear myopathies) nese také název dědičná myopatie labradorských retrieverů (HMLR; hereditary myopathy of Labrador retrievers) jelikož je toto onemocnění spojováno právě s tímto plemenem (Mauer *et al.* 2012). V roce 2012 však Eminaga *et al.* popsali první případ CMN také u border kolie.

CMN způsobuje defektní vývoj svalových vláken. Prvním příznakem je výrazné hubnutí štěnat ve druhém týdnu věku. Ve věku jednoho měsíce psi postižení CMN vykazují absenci šlachových reflexů. Za jeden až tři měsíce dochází k rozvoji svalové atrofie projevující se vratkou chůzí, v krajních případech úplnou neschopností chůze, vratkým postojem a sníženou tolerancí zátěže. Zasaženo bývá také polykací svalstvo, takže hrozí plicní záněty způsobené vdechnutím potravy (Eminaga *et al.* 2012; Mauer *et al.* 2012; Pelé *et al.* 2005).

U labradorů se je CMN děděna autosomálně recesivně a způsobuje ji inserce SINE v exonu 2 genu *PTPLA* (g.9459\_9460ins236 PLPLA). U BOC je předpokládám stejný způsob dědičnosti, avšak kauzální mutace není pro toto plemeno zatím známá (Eminaga *et al.* 2012).

Spolehlivá diagnostika je možná právě díky včasnému zpozorování prvních příznaků onemocnění. Na CMN neexistuje účinná léčba a postižení jedinci proto bývají utraceni (Mauer *et al.* 2012).

Psi CMN byla použita jako modelové onemocnění pro výzkum lidské centronukleární myopatie (Tiret *et al.* 2003).

### 6.14 Maligní hypertermie

Maligní hypertermie (MH; malignant hyperthermia) je nejčastěji spojována s greyhoundem, Svatobernardským psem, border kolií, pointrem a plemeny španělů, genetický test je však možný provést pro jakékoli plemeno. Jedná se farmakogenetickým syndromem kosterního svalstva vyvolanou chemickým spouštěčem – anestetiky (halotan, sevofluran, isofluran aj.) (Brunson a Hogan 2004; O'Brien 1993). Postižení jedinci nevykazují žádné klinické příznaky, po vystavení



spouštěče u nich však dochází k tachykardii, hypertermii a hyrkapii. Pokud není anestezie včas přerušena, může dojít k úhynu zvířete v důsledku selhání ledvin, aritmie a rabdomyolýzy (Brunson a Hogan 2004; Roberts *et al.* 2001).

Syndrom MH s autozomální dědičností je způsoben substitucí C za T, způsobující záměnu aminokyselin valinu a alaninu na pozici 547 (p.Val547Ala) (Roberts *et al.* 2001). Mutace se nachází v oblasti pro ryanodinový receptor, který je součástí kanálu uvolňujícího kalcium v sarkoplazmatickém retikulu. Při kontaktu se spouštěčem je díky mutaci v receptoru uvolňováno nekontrolované množství kalcia ze sarkoplazmatického retikula. Výsledkem je prodloužení svalových kontrakcí bez relaxace, hypertermie a nadprodukce oxidu uhličitého způsobené snahou odčerpat přebytečné kalcium za vysoké spotřeby kyslíku (Yang *et al.* 2006; Roberts *et al.* 2001).

V případě propuknutí MH je důležité okamžitě přerušit anestezii, chladit organismus a podat postiženému jedinci látky snižující svalové napětí (antidotika) (Brunson a Hogan 2004).

## **7. Materiál a metody**

### **7.1 Materiál**

Chovatelé border kolii poskytli celkem 95 vzorků DNA od zástupců tohoto plemene. Bylo testováno 43 psů a 52 fen, všichni s průkazem původu. 93 % jedinců pocházelo z českých chovů, 7 % bylo importováno z USA, Maďarska, Rakouska, Slovenska, Velké Británie a Itálie. 28 jedinců bylo dříve testováno na TNS, 12 na MDR1 a pouze 1 na IGS. Každému z chovatelů byl zaslán informační dotazník, ve kterém byl uveden věk psa, zda byli pes a jeho rodiče již dříve testováni na vybraná genetická onemocnění a také číslo zápisu ČMKU kvůli možnosti ověření vystavení průkazu původu (příloha 1). Po oboustranné dohodě s chovateli zůstávají výsledky jednotlivých psů anonymní.

### **7.2 Metody**

#### **7.2.1 Odběr vzorků**

Pro získání vzorku byl zvolen stěr bukální sliznice. Chovatelům byly zaslány jednorázové štětičky pro setření sliznice ústní dutiny, uložené v papírovém sáčku. U testovaného psa, který nesmě být alespoň hodinu před odběrem krměn z důvodu kontaminace vzorku, bylo po dobu asi dvaceti vteřin prováděno opakované otírání dásní a vnitřních stran tváří. Po provedení stěru byla zaschlá štětička uložena zpět do papírového sáčku, v plastovém hrozilo znehodnocení DNA. Při celém procesu odběru bylo třeba dbát na zamezení případné kontaminace (GENOMIA 2018).

#### **7.2.2 Izolace DNA**

Izolace DNA byla provedena z nativního materiálu pomocí Chelexu 100. Tato chelatační pryskyřice složená ze styren divinylbenzen kopolyméru obsahuje párové iminodiacetátové ionty, které jsou schopny vázat ionty kovu. Při izolaci DNA je relevantní inaktivování  $Mg^{2+}$  iontů, které mohou při vysokých teplotách způsobit poškození DNA (Lamballerie *et al.* 1992; Walsh *et al.* 1991).

Základním krokem izolace byla homogenizace vzorku. Stěrová štětička byla za občasného otočení inkubována po dobu 10 minut v 1,5 ml mikrozkuhavce s 1 ml

destilované vody. Díky následné centrifugaci bylo možné odstranit supernatant. Do mikroskopické kumavky s peletem byl přidán 1 µl Proteinázy K o koncentraci 0,5 µg/µl, poté byla vortexována a krátce centrifugována. Takto připravený materiál byl inkubován po dobu 45 minut při teplotě 56°C. Druhá inkubace probíhala 10 minut při teplotě 98°C. Před i po druhé inkubaci byl vzorek vortexován 10–15 sekund. Na závěr proběhla centrifugace (5 minut). Vzorek DNA byl uchováván při teplotě – 20°C.

### 7.2.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR; polymerase chain reaction) je metoda amplifikace vybraného úseku DNA, který je ohraničen oligonukleotidy - primery. Jde o fragmenty DNA (6–25 nukleotidů) přisedající ke koncům vybraného úseku, od kterých probíhá syntéza DNA. Upřednostňovány jsou primery s 50–60 % obsahem AT nebo GC párů. K syntéze je využíván termostabilní enzym *Taq* polymeráza zachovávající si aktivitu i přes opakované působení vysokých teplot. Tato DNA polymeráza syntetizuje komplementární řetězec (Hadidi *et al.* 2013; Mullis *et al.* 1989). Reakční fáze PCR jsou:

- **Denaturace**

Při denaturaci je dvouvláknová molekula DNA zahřívána na teplotu 94–98 °C po dobu 20 - 30 sekund. Následkem je rozvolnění vodíkových můstků a nevázanost dvoušroubovice, čímž vzniknou dvě jednovláknové molekuly DNA (templáty).

- **Hybridizace**

Nasednutí primerů umožňuje snížení teploty reakce na 35–65 °C, při které je možná opětovná renaturace a pevné nasednutí primeru. Teplota v průběhu hybridizace je velmi důležitá, při nízké teplotě hrozí vytvoření nespecifického produktu nasednutím primerů na jen částečně komplementární sekvence.

- **Elongace, extenze, syntetická fáze**

Při této fázi PCR je teplota závislá na použité DNA polymeráze. Při použití nejběžnější *Taq* polymerázy je teplotní optimum pro syntézu nových řetězců v rozmezí 72–80°C. Komplementární vlákno DNA přirůstá k původní molekule DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci. Jednotlivé reakční fáze se cyklicky opakují v termocycleru (obvykle stačí 30 cyklů).

**Tab. 1: Použité teplotní profily**

| <b>MDR1</b>       | <b>Teplotní profil</b> |            |
|-------------------|------------------------|------------|
|                   | <b>Teplota °C</b>      | <b>Čas</b> |
| Úvodní denaturace | 95                     | 10 min     |
| 45 cyklů          | 95                     | 30 s       |
|                   | 57                     | 30 s       |
|                   | 72                     | 30 s       |
| Extenze           | 72                     | 7,3 min    |
| <b>TNS</b>        |                        |            |
| Úvodní denaturace | 94                     | 2 min      |
| 45 cyklů          | 94                     | 60 s       |
|                   | 55                     | 60 s       |
|                   | 72                     | 60 s       |
| Extenze           | 72                     | 2 min      |
| <b>IGS</b>        |                        |            |
| Úvodní denaturace | 95                     | 10 min     |
| 45 cyklů          | 95                     | 15 s       |
|                   | 58                     | 1 min      |
|                   | 72                     | 30 s       |
| Extenze           | 72                     | 7 min      |

### 7.2.3.1 Složení reakce

Reakce byla připravována v objemu 25  $\mu$ l a obsahovala tyto reakční komponenty:

#### Primery

Oligonukleotidy dodané výrobcem bylo třeba před použitím naředit. Lyofilizovaný primer byl krátce centrifugován a následně ředěn na koncentraci 100 pmol/ $\mu$ l sterilní vodou a vortexována. Takto připravený 0,1 nM roztok byl dále ředěn 10x - 10  $\mu$ l zásobního roztoku bylo přidáno do 90  $\mu$ l vody. Tímto vznikl 10  $\mu$ M pracovní roztok. Pro 25  $\mu$ l bylo použito 0,5  $\mu$ l z obou primerů (příliš vysoká koncentrace by mohla způsobit nespecifické nasedání primerů nebo vzájemné párování).

**Tab. 2: Použité primery**

|        |  |
|--------|--|
| MDR1 F | 5'- GCA GTG GGG TGA GAA CTA GA – 3'                                |
| MDR1 R | 5'- CGC AAG CCA TGT AAG GTA TG -3'                                 |
| TNS F  | 5'- AAT ATT GAC CCA GTC TTA – 3'                                   |
| TNS R  | 5'- TCT ACT GGT TCG TTT CTG – 3'                                   |
| IGS F  | 5'-AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG CTT TCT TGC TCA<br>TTT TCG TGA T-3' |
| IGS R  | 5'- GCA TGC TGG AGA TTG CAC AC – 3'                                |

### Templátová DNA

Pro reakci byl použit 1µl získané DNA. Velké množství použité DNA mohlo způsobovat reakční problémy.

### Master Mix

Master Mix je složen ze tří komponentů a to ze směsi nukleotidů dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), jejíž použité množství závisí na koncentraci zásobního roztoku, MgCl<sub>2</sub> nutného pro přesnost a procesivitu *Taq* polymerázy a reakčního pufru, který dodává reakci potřebné pH a ideální koncentraci solí. Byl použit 2x koncentrovaný PPP Mater Mix (TopBio) o složení: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml *Taq* DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva.

### Voda

Využívá se purifikovaná a sterilní voda, skladovaná stejně jako ostatní komponenty při teplotě – 20 °C.

**Tab. 3: Složení PCR reakce v objemu 25 µl**

| <b>Komponenta</b> | <b>Finální koncentrace</b> |
|-------------------|----------------------------|
| PPP Master Mix    | 12,5 µl                    |
| F Primer          | 0,5 µl                     |
| R Primer          | 0,5 µl                     |
| H <sub>2</sub> O  | 10,5 µl                    |
| Templátová DNA    | 1 µl                       |

### 7.2.4 Restrikční analýza

Pokud DNA obsahuje konkrétně specifikovanou sekvenci nukleotidů, díky restrikční analýze (RFLP; restriction fragment length polymorphism) je možné ji štěpit. K tomuto štěpení RFLP využívá restriktázy (restrikční endonukleázy), které se nejčastěji nacházejí u bakterií, kde tvoří obranný mechanismus proti virům. Restrikční štěpení probíhá na fosfodiesterové vazbě obou řetězců DNA. Pokud alela určitého genu zahrnuje rozpoznávací sekvenci, bude DNA této alely rozštěpeno a během elektroforézy fragmentů pro ni nalezneme dva kratší úseky (Olive a Bean 1999).

PCR-RFLP byla aplikována při testování MDR1 (Mizukami 2013) a IGS (Fife 2014). Pro objem 20 µl bylo smícháno 15 µl amplifikovaného PCR produktu s 5 µl RFLP Master Mixu (2 µl reakčního bufferu, 0,5 µl restrikční endonukleázy, 205 µl H<sub>2</sub>O). Byly použity restrikční enzymy *MboI* (MDR1) a *Msl I* (IGS). Směs byla inkubována při teplotě 37 °C na 6 hodin (tab. 4).

**Tab. 4: Složení RFLP v objemu 20 µl**

| <b>Komponenta</b> | <b>Finální koncentrace</b> |
|-------------------|----------------------------|
| PCR produkt       | 15 µl                      |
| Reakční buffer    | 2 µl                       |
| Restriktáza       | 0,5 µl                     |
| H <sub>2</sub> O  | 0,5 µl                     |

### 7.2.5 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforéza je založena na rozdílné pohyblivosti fragmentů v závislosti na jejich velikosti. Díky zápornému náboji se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují od katody k anodě a během tohoto pohybu se molekuly separují na základě prostorového uspořádání atomů a své délce. Separace molekul probíhá v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Důležitá je jeho koncentrace, která ovlivňuje rychlost separace (vyšší koncentrace jsou vhodnější pro separaci krátkých fragmentů). Jednotlivé fragmenty jsou detekovány pomocí ethidium bromidu pod UV světlem (Johansson 2009).

Množství připravovaného gelu bylo závislé na počtu vzorků a jeho koncentrace na typu fragmentů, které byly separovány (byl použit 3 a 4 % agarózový gel). Agaróza byla smíchána s puftrem v Erlenmayerově baňce a rozpouštěna v mikrovlnné troubě po dobu 1–2 minut za občasného promíchání. Když v roztoku nebyla patrná zrnka agarózy, gel byl částečně ochlazen pod proudem studené vody a po přidání ethidium bromidu nalit do připravené ELFO vaničky. Po ztuhnutí, odstranění hřebínku a utěsnění byl vyjmutý gel usazen do elektroforetické vany s ELFO roztokem a překryt víkem. ELFO zdroj byl nastaven na 70 V po dobu od 100–160 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel vyndán z ELFO vany a vizualizován pod UV světlem.

Pro přesnější vyhodnocení výsledků byl také použit mikročipový elektroforetický analyzátor DNA/RNA MultiNA, který je plně automatický. Analýza je provedena „on-chip“ fluorescenční detekcí bez použití ethidium bromidu (Marek 2011).

## 8. Výsledky a diskuse

V moderním chovu psů je velmi důležité dbát nejen na exteriér ale také na zdravotní stav chovných jedinců. K tomu nám pomáhají genetické analýzy odhalující četné geneticky podmíněné choroby. Pro tuto práci bylo zvoleno plemeno border kolie z důvodu jeho popularity, jde totiž o jedno z nejoblíbenějších a nejrozšířenějších psích plemen po celém světě. Právě kvůli četnosti border kolií byl předpokládán dostatečný zájem chovatelů poskytujících vzorky DNA zástupců plemene s průkazem původu. Testovány byly tři dědičné choroby: syndrom uvězněných neutrofilů (TNS), mnohočetná léková rezistence (MDR1) a střevní malabsorbce kobalaminu neboli Imerslund-Gräsbeckův syndrom (IGS).

**Tab. 5: Frekvence genotypů a alel u analyzované skupiny psů.**

|             | Frekvence genotypů |       |    | Frekvence alel |      |
|-------------|--------------------|-------|----|----------------|------|
|             | AA                 | Aa    | aa | A              | a    |
| <b>TNS</b>  | 0,955              | 0,045 | 0  | 0,98           | 0,02 |
| <b>MDR1</b> | 1                  | 0     | 0  | 1              | 0    |
| <b>IGS</b>  | 1                  | 0     | 0  | 1              | 0    |

Z celkového počtu 95 vzorků se podařilo izolovat DNA u 89 jedinců. U stejného počtu byla úspěšně provedena nejprve PCR analýza v souvislosti s TNS, při které byli 4 jedinci plemene border kolie vyhodnoceni jako přenašeči mutace g.4411956\_4411960delGTTT genu *VPS13B*. Frekvence mutované alely v pozorovaném souboru činí 0,02. Dále byla provedena PCR-RFLF analýza pro MDR1 a IGS u stejného počtu jedinců. Pro mutace AF045016.1: c.227\_230delATAG genu *MDR1* (MDR1) a c.8392delC genu *CUBN* (IGS) nebyl detekován žádný přenašeč ani afektovaný jedinec. Frekvence mutované alely pro obě mutace pro sledovaný soubor vzorků tedy činí 0 (tab. 5).

Izolace DNA se u zvířat nejčastěji provádí z krevních vzorků. Pro tuto práci byl zvolen způsob získání DNA ze slin stěrem bukalní sliznice z důvodu usnadnění odběru pro majitele psů. Tento způsob izolace DNA je běžně využíván certifikovanými laboratořemi (GENOMIA 2018). Bylo nám zasláno celkem 95 stěrových kartáčků s odebranou DNA od čistokrevných jedinců plemene border kolie, z nichž se



u 6 nepodařilo DNA izolovat. To bylo patrně ve všech případech způsobeno nedodržením postupu při odebírání vzorků. Ve většině případů se jednalo o viditelné znečištění odběrové špetičky krmivem, nebyl tedy dodržen hodinový interval před odběrem, během něhož nemělo být psům podáváno krmení ani pamlsky. Obdobný postup při odběru vzorků doporučují také certifikované laboratoře (GENOMIA 2018). Dostatečné množství DNA potřebné k testování výše zmíněných mutací jsme získali také z cibulek ocasních chlupů. Tento způsob by však pro naše účely nebyl efektivní z hlediska dopravy vzorků do laboratoře. Pro izolaci genomové DNA byly chlupové cibulky použity například při určování paternity u psů (Škrobánková 2006).

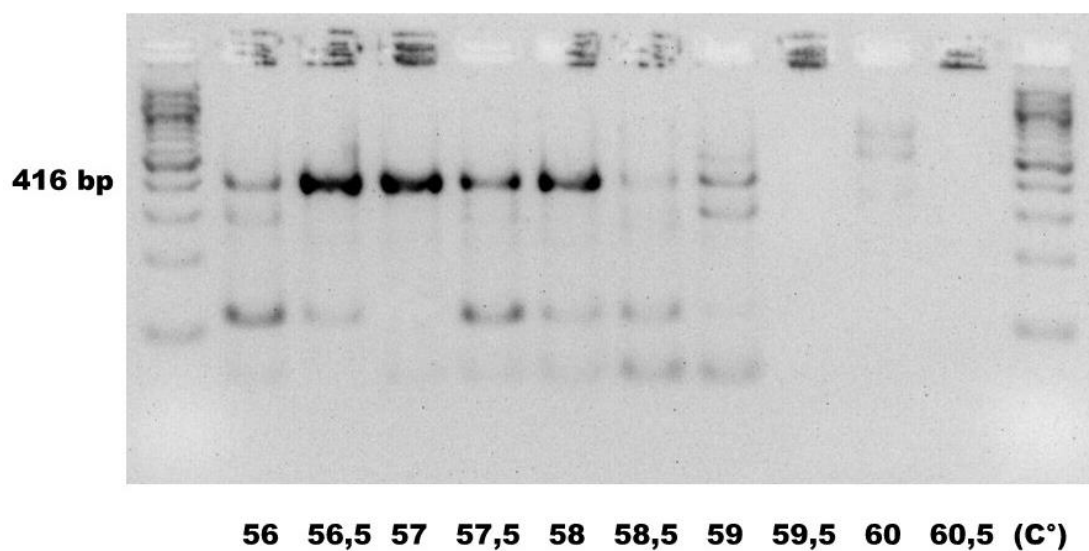
Před konečnou detekcí a analýzou genotypů sledované skupiny psů byly provedeny analýzy testovací, kvůli ověření kvality amplifikace u vybraných metodik (tab. 6) Metodika dle Mizukamiho (2012) pro TNS se ukázala být optimální. Metodiky dle Geyera (2005) a Mizukamiho (2013) pro MDR1 bylo nutné pro naše laboratorní podmínky fyzikálně optimalizovat. U Mizukamiho teplotního profilu byl pro fázi annealingu zvolen teplotní gradient od 53-62 °C (vždy po 0,5 °C). Při teplotě 57 °C byl naaplifikovaný produkt dostatečně kvalitní, bez nespecifických pásem a vznikl tak optimální teplotní profil pro detekci MDR1 (obr. 11). Optimalizace druhého a podstatně složitějšího teplotního profilu dle Geyera byla z tohoto důvodu přerušena. Pro IGS byl vytvořen vlastní teplotní profil. Prvotní denaturace obvykle probíhá při teplotách 92-95°C. Pro fázi annealingu může být teplota stanovena pomocí několika vzorců např.  $T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \times (C+G)$ , kdy je za A, T, C a G dosazen přesný počet příslušných bází zastoupený v použitém primeru. Další možností výpočtu nasedací teploty je využití speciálních softwarů či se orientovat dle tabulky nasedání primerů viz. tab. 7. Čas annealingu je zpravidla řízen počáteční koncentrací templátové DNA (Vojtová 2013). Pro IGS byl zvolen teplotní gradient s horní  $T_A = 59 \text{ °C}$  a spodní  $T_A = 50 \text{ °C}$ . Teplota extenze byla dle použité DNA polymerázy stanovena na 72°C. Dobu trvání určuje délka produktu (Vojtová 2013).

**Tab. 6: Optimalizace použitých teplotních profilů.**

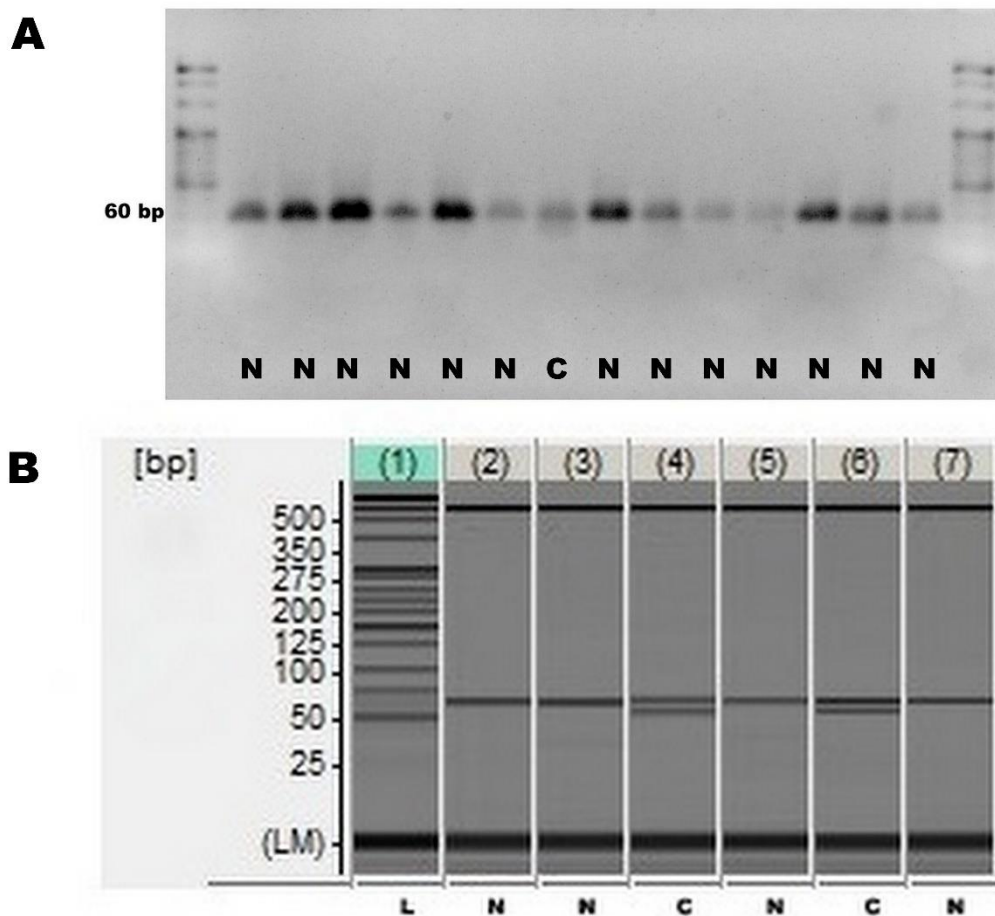
| <b>MDR1</b>                  | <b>Teplotní profil</b> |            | <b>Optimalizace t. p.</b> |            |
|------------------------------|------------------------|------------|---------------------------|------------|
|                              | <b>Teplota °C</b>      | <b>Čas</b> | <b>Teplota °C</b>         | <b>Čas</b> |
| Úvodní denaturace            | 95                     | 10 min     | 95                        | 10 min     |
| 45 cyklů                     | 95                     | 30 s       | 95                        | 30 s       |
|                              | 60                     | 30 s       | 57                        | 30 s       |
|                              | 72                     | 30 s       | 72                        | 30 s       |
| Extenze                      | 72                     | 7,3 min    | 72                        | 7,3 min    |
| <b>MDR1*</b>                 |                        |            |                           |            |
| Úvodní denaturace            | 94                     | 2 min      | -                         | -          |
| 10 cyklů<br>touch down – 0,5 | 95                     | 15 s       | -                         | -          |
|                              | 55                     | 15 s       | -                         | -          |
|                              | 72                     | 10 s       | -                         | -          |
| 22 cyklů                     | 95                     | 15 s       | -                         | -          |
|                              | 50                     | 15 s       | -                         | -          |
|                              | 72                     | 10 s       | -                         | -          |
| Extenze                      | 72                     | 10 min     | -                         | -          |
| <b>TNS</b>                   |                        |            |                           |            |
| Úvodní denaturace            | 94                     | 2 min      | -                         | -          |
| 45 cyklů                     | 94                     | 60 s       | -                         | -          |
|                              | 55                     | 60 s       | -                         | -          |
|                              | 72                     | 60 s       | -                         | -          |
| Extenze                      | 72                     | 2 min      | -                         | -          |
| <b>IGS</b>                   |                        |            |                           |            |
| Úvodní denaturace            | -                      | -          | 95                        | 10 min     |
| 45 cyklů                     | -                      | -          | 95                        | 15 s       |
|                              | -                      | -          | 58                        | 1 min      |
|                              | -                      | -          | 72                        | 30 s       |
| Extenze                      | -                      | -          | 72                        | 7 min      |

**Tab. 7: Teploty (°C) nasedání primerů pro daný počet bazí a GC párů (LABGuide 2017).**

| Bp | POČET GC PÁRŮ |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|    | 6             | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 16 | 39            | 41 | 43 | 25 | 47 | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 |    |    |
| 17 | 43            | 45 | 47 | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 |    |
| 18 | 45            | 47 | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 67 |
| 19 | 47            | 49 | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 |
| 20 | 49            | 51 | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 |
| 21 | 51            | 53 | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 |
| 22 | 53            | 55 | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 77 |
| 23 | 55            | 57 | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 77 | 79 |
| 24 | 57            | 59 | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 77 | 79 | 91 |
| 25 | 59            | 61 | 63 | 65 | 67 | 69 | 71 | 73 | 75 | 77 | 79 | 81 | 83 |



**Obr. 11: Ukázka teplotního gradientu použitého pro optimalizaci fáze annealingu při analýze mnohočetné lékové rezistence u border kolií. Hledaná délka výsledné alely byla 416 bp.**



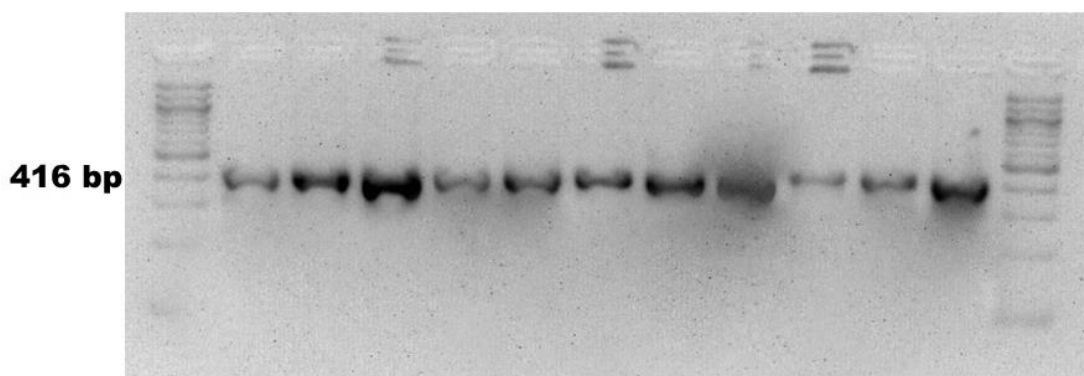
**Obr. 12:** Genotypizace TNS přenašečů (C) a zdravých jedinců (N). Vyhodnocení pomocí elektroforézy na 3 % agarózovém gelu (A) nebylo vzhledem ke špatné viditelnosti malých fragmentů dostatečně průkazné, proto byla použita mikročipová elektroforéza (B). Z 89 testovaných jedinců plemene byli 4 vyhodnoceni jako přenašeči mutace g.4411956\_4411960delGTTT genu *VPS13B*.

Syndrom uvězněných neutrofilů je způsoben deleční mutací g.4411956\_4411960delGTTT v exonu 19 psího genu *VPS13B* (Gans 2015). Diagnostika TNS se provádí na základě genetických testů, jelikož klinicko-patologické údaje mohou být snadno modifikované řadou zánětlivých a infekčních chorob (Mason *et al.* 2014). Genotypizace TNS zahrnovala PCR amplifikaci genomové DNA za využití teplotního profilu dle Mizukamiho *et al.* (2011). Pro separaci molekul byl při elektroforéze použit 3 % (wt/vol) agarózový gel. Jelikož kauzální mutací pro TNS je 4-bp delece (GTTT) byla následně zvolena mikročipová elektroforéza z důvodu přesnější analýzy (obr. 12). Bylo prokázáno, že mutovaná alela má velikost 56 bp a standardní alela 60 bp. V souboru 89 vzorků byli zjištěni 3 psi a 1 fena heterozygotní pro tuto mutaci. U tří z těchto jedinců byla

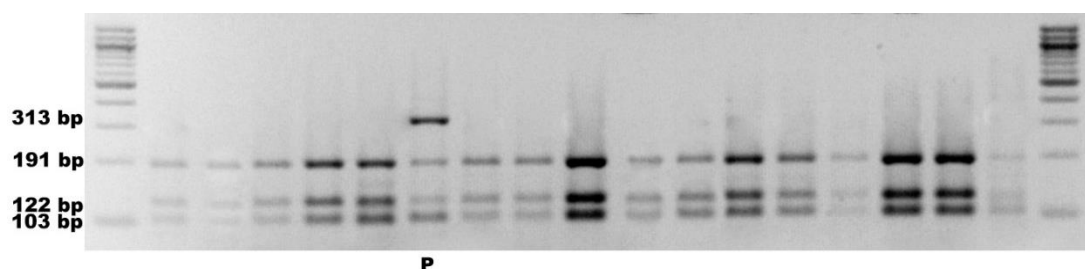
přítomnost mutované alely potvrzena také akreditovanou laboratoří. Jeden ze zjištěných přenašečů byl importován ze zahraničního chovu. Relativní frekvence mutované alely v pozorovaném souboru tedy činí 0,02 (tab. 5), pro světovou populaci BOC byla dle Shearmana a Wiltona (2011) frekvence mutované alely stanovena na 0,064 (v populaci 2094 jedinců bylo 12,9 % přenašečů TNS). Vzhledem k autozomálně recesivnímu charakteru mutace můžeme v případě spojení dvou heterozygotů předpokládat složení vrhu z 50 % heterozygotních jedinců – přenašečů a 25 % jedinců postižených TNS. Kvůli prevenci a eradikaci tohoto onemocnění v chovné populaci ČR musí mít od roku 2012 alespoň jeden z rodičů plánovaného vrhu TNS normal. V České republice byl zaznamenán pouze jeden TNS vrh border kolíí (Gans 2015).

Mutace AF045016.1: c.227\_230delATAG genu *MDR1* způsobuje předčasný stopkodon při syntéze P-glykoproteinu. Disfunkce této bílkoviny může u psů vyvolat potencionálně smrtelnou neurotoxickou reakci způsobenou pronikáním látek do centrální nervové soustavy (Gramer *et al.* 2010). Pro MDR1 byly použity dva teplotní profily. Amplifikovat DNA s primery F: 5'-ATTGGCTTGATAGGTTGTATATG-3' a R: 5'-CAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTT-3' při teplotním profilu dle Geyera (2005) se podařilo až po optimalizaci. Přesto byla detekce a analýza po amplifikaci obtížná kvůli vzniku nespecifických pásem. Proto tato metodika nebyla při konečné analýze použita. Metodika PCR-RFLP dle Mizukamiho (2013) byla optimalizována na teplotu počáteční denaturace 95 °C po dobu 10 minut, 45 cyklová amplifikace při teplotě denaturace 95 °C na 30 sekund, nasedání primerů při teplotě 57 °C 30 sekund a syntéza na 72 °C po dobu 30 sekund. Závěrečná extenze probíhala na 7,3 minuty při teplotě 72 °C za použití primerů F: 5'-GCAGTGGGGTGAGAACTAGA-3' R: 5'-CGCAAGCCATGTAAGGTATG-3'. Při RFLP analýze byl amplifikační produkt u nepostiženého jedince štěpen na 3 fragmenty (191 + 122 + 103 bp) a u přenašeče na 4 fragmenty (313 + 191 + 122 + 103 bp). U afektovaných jedinců by amplikon obsahoval jedno štěpící místo (313 + 103 bp). Mezi testovanými psy byly pouze nepostižení jedinci (obr. 13; obr. 14). To potvrzuje prohlášení BCCCZ, že žádný čistokrevný zástupce plemene BOC v ČR není nositelem této homozygotní delece. Pro ověření správnosti metodiky byl při analýze použit kontrolní vzorek australského ovčáka, který je

potvrzeným přenašečem dané choroby. Největší frekvence mutované alely se vyskytuje v populacích krátkosrsté a dlouhosrsté kolie (33 %) (Gramer *et al.* 2010).



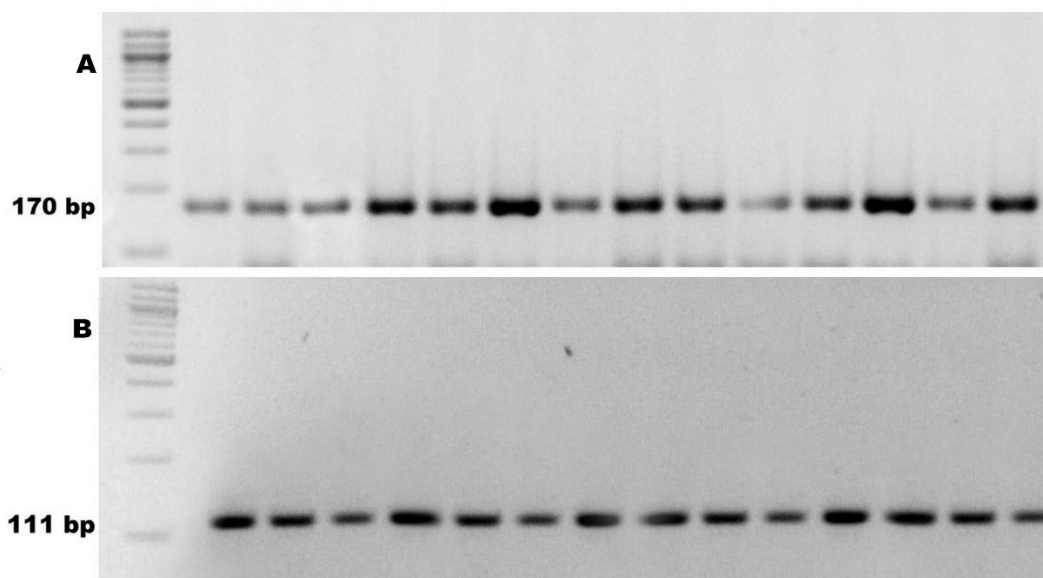
Obr. 13: Výsledek gelové elektroforézy amplifikovaných PCR produktů pro *MDR1* před restrikční analýzou.



Obr. 14: Výsledek PCR-RFLP analýzy pro *MDR1* za použití restrikčního enzymu *MbolI*. Všichni testovaní jedinci plemene BOC byli vyhodnoceni jako normal. Pro ověření správnosti metodiky byl použit vzorek DNA od jedince plemene australský ovčák, který je potvrzeným přenašečem mutace AF045016.1: c.227\_230delATAG genu *MDR1* (P).

Mutace c.8392delC genu *CUBN* způsobuje u border kolií střevní malabsorpci kobalaminu. Jako předchozí dvě mutace i tato je děděna autozomálně recesivně, choroba se tedy projeví pouze u jedinců s mutací v obou kopiích genu (Owczarek-Lipska *et al.* 2013). Pro IGS navrhl Fyfe (2014) primery F: 5'-AGGGTTTTCCCAGTCACGACGC TTTCTTGCTCATTTCGTGAT-3' a R: 5'-GCATGCTGGAG ATTGCACAC-3', jeho pokus však nebyl kvůli absenci profilu zopakovatelný. Byla tedy provedena optimalizace protokolu k PPP Master Mixu. Po počáteční denaturaci při 95 °C po dobu 10 minut byla provedena amplifikace o 45 cyklech při teplotě denaturace 95 °C na 15 sekund, nasedání primerů při teplotě 58 °C 1 minutu a syntézou za teploty 72 °C po dobu 30 sekund. Závěrečná extenze probíhala na 7 minut při teplotě 72 °C. Po štěpení restrikčním enzymem *Msl I* měly alely u všech vzorků velikost 111 bp. Jedná se o standardní délku a všichni testovaní psi mají tedy výsledek normal. U afektovaných jedinců by byla délka mutované

alely 134 bp a u přenašečů mutace by při RFLP došlo k rozštěpení na 2 fragmenty 111 + 134 bp. Pro ČR tedy doposud nebyl oznámen jedinec postižený touto mutací. Owczarek-Lipska et al. (2013) ve své práci uvádí 6 % prevalenci nosičství mutované alely u vzorku 203 evropských kolí.



**Obrázek 15: Genotypizace 14 jedinců v souvislosti s mutací genu *CUBN*. U amplifikované DNA (A) má standardní alela velikost 170 bp, po restričním štěpení je standardní délka alely 111 bp (B). Všechny 89 testovaných jedinců bylo pro mutaci c.8392delC genu *CUBN* vyhodnoceno jako normal.**

## 9. Závěr

U border kolie bylo do současnosti popsáno hned několik geneticky podmíněných onemocnění. Plemeno je nejčastěji spojováno se syndromem uvězněných neutrofilů, progresivní atrofií sítnice a anomálií oka kolií. V případě, že známe kauzální mutaci způsobující dané onemocnění, je možné díky moderním metodám molekulární genetiky spolehlivě určovat přenašeče a tím eliminovat šíření této mutace v populaci. Mezi významná genetická onemocnění border kolie, u kterých známe odpovědnou mutaci, patří právě syndrom uvězněných neutrofilů, Imerslund-Gräsbeckův syndrom, mnohočetná léková resistance, degenerativní myelopatie, dentální hypomineralizace, neuronální ceroidní lipofuscinóza a maligní hypertermie. Kauzální mutaci známe také pro anomálii oka kolií, vyšetření psů na toto onemocnění však nejčastěji probíhá oftalmologicky. Dalšími genetickými chorobami, pro které mají border kolie predispozici, patří Pelger–Huëtova anomálie, idiopatická epilepsie, progresivní retinální atrofie, primární luxace čočky, primární glaukom a centronukleární myopatie. U těchto dědičných onemocnění nebyla příčinná mutace doposud zjištěna, a proto není možné provádět jejich diagnostiku pomocí genetických testů.

Nejdůležitějším faktorem v eliminaci těchto onemocnění u psů je důsledná selekce. Díky selekci mohou chovatelé a chovatelské kluby podstatně ovlivnit genetickou kvalitu budoucích generací a tím samozřejmě i kvalitu celé populace daného plemene. Proto je důležité stanovit kritéria výběru tak, abychom byli schopni odhadnout genotypovou hodnotu chovných jedinců. Jedním ze způsobů odhadu genotypových vlastností psů je rodokmenová hodnota. Právě v rodokmenu je možné nalézt výsledky povinných vyšetření nařízených klubem. Užitečné jsou také databáze pro konkrétní dědičná onemocnění, které chovatelům poskytují informace o plemenné hodnotě posuzovaných jedinců. Například databáze pro psy se syndromem uvězněných neutrofilů, která vznikla v České republice, dnes zahrnuje jedince z Německa, Belgie, Polska, Velké Británie a dalších 26 států. Mnoho dědičných chorob u psů vzniklo díky příbuzenské plemenitbě. I v tomto případě je stěžejní dokonalý odhad genotypové hodnoty metodami kontroly dědičnosti, díky kterým můžeme předcházet upevnění nežádoucích znaků a vlastností v populaci. Vzhledem k podmínkám chovnosti stanovených Českým chovatelským klubem border kolií můžeme zdejší populaci



považovat za poměrně zdravou, jelikož nejfrekventovanější geneticky podmíněná onemocnění jsou spolehlivě monitorována.

## 10. Zdroje použité literatury

ACLAND, Gregory M. Retinal Disorders in Border Collies 2002, 1-14

ALVES, L., V. HÜLSMEYER, A. JAGGY, A. FISCHER, T. LEEB a M. DRÖGEMÜLLER. Polymorphisms in the ABCB1 Gene in Phenobarbital Responsive and Resistant Idiopathic Epileptic Border Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011, 25, 484–489

BAARS, Cordula, Tosso LEEB, Thilo VON KLOPMANN, Andrea TIPOLD a Heidrun POTSCHKA. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *Veterinary journal*. 2008, (177(3), 394-397 DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.05.020. ISBN 10.1016/j.tvjl.2007.05.020.

BCC CZ. JEDNOTNÉ PODMÍNKY CHOVNOSTI pro všechny jedince plemene border kolie zapisované v plemenné knize ČMKU [online]. 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: [https://www.bcccz.cz/rady\\_bcccz/jednotne\\_podminky\\_chovu\\_boc.pdf](https://www.bcccz.cz/rady_bcccz/jednotne_podminky_chovu_boc.pdf)

BCC CZ. Border Collie Club Czech Republic [online]. 2018 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: <http://www.bcccz.cz/>

BEDFORD, P. G. C. The aetiology of primary glaucoma in the dog 1. *Journal of small animal practise*. 1975 DOI: 10.1111/j.1748-5827.1975.tb05739.x. ISBN 10.1111/j.1748-5827.1975.tb05739.x.

BISHOP, Micah A., Panagiotis G. XENOULIS, Nora BERGHOFF, Niels GRÜTZNER, Jan S. SUCHODOLSKI a Jörg M. STEINER. Partial characterization of cobalamin deficiency in Chinese Shar Peis. *The Veterinary Journal* 2012, 191(1), 41-45 DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.05.008. ISBN 10.1016/j.tvjl.2011.05.008.

BOUHENNI, Rachida, Jeffrey DUNMIRE, Abby SEWELL a Deepak P. EDWARD. Animal Models of Glaucoma. Abstract Full-Text PDF Full-Text HTML Full-Text ePUB Full-Text XML Linked References Citations to this Article How to Cite this Article Complete Special Issue *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 DOI: 10.1155/2012/692609. ISBN 10.1155/2012/692609.

BOY, Sonja, David CROSSLEY a Gerhard STEENKAMP. Developmental Structural Tooth Defects in Dogs – Experience From Veterinary Dental Referral Practice and Review of the Literature. *Frontiers in Veterinary Science* 2016, 1-13 DOI: 10.3389/fvets.2016.00009. ISBN 10.3389/fvets.2016.00009.

BRUNSON, David B. a Kirk J. HOGAN. Malignant hyperthermia: a syndrome not a disease. *Veterinary Clinics Small Animal Practise* 2004, 34, 1419-1433. DOI: 10.1016/j.cvsm.2004.05.010. ISBN 10.1016/j.cvsm.2004.05.010.

CRISP, Matthew J., Jeffrey BECKETT, Joan R. COATES a Timothy M. MILLER. Canine degenerative myelopathy: Biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Experimental Neurology* 2014, 23, 1-9 DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.05.009. ISBN 10.1016/j.expneurol.2013.05.009.

DAY, M.J. *Clinical Immunology of the Dog and Cat. 2.* London: Manson, 2011. ISBN 978-1-840-76098-9.

DEKOMIEN, G., M. RUNTE, R. GÖDDE a J.T. EPPLER. Generalized progressive retinal atrophy of Sloughi dogs is due to an 8-bp insertion in exon 21 of the PDE6B gene. *Cytogenetics and Cell Genetics* 2000, 90/3-4, 261–267 DOI: 10.1159/000056785. ISBN 10.1159/000056785.

DE LAMBALLERIE, X, C ZANDOTTI, C VIGNOLI, C BOLLET a P DE MICCO. A one-step microbial DNA extraction method using “Chelex 100” suitable for gene amplification. *Elsevier* 1992, 143/8, 785-790 DOI: 10.1016/0923-2508(92)90107-Y. ISBN 10.1016/0923-2508(92)90107-Y.

DRÖGEMÜLLER, Michaela, Vidhya JAGANNATHAN, Judith HOWARD, Rémy BRUGGMANN, Cord DRÖGEMÜLLER, Maja RUETTEN, Tosso LEEB a Peter H. KOOK. A frameshift mutation in the cubilin gene (CUBN) in Beagles with Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *Animal genetics* 2014, 45(1), 148-150 DOI: 10.1111/age.12094. ISBN 10.1111/age.12094.

EMINAGA, S., G. B. CHERUBINI a G. D. SHELTON. Centronuclear myopathy in a Border collie dog. *Journal of Small Animal Practice* 2012, 53, 608–612 DOI: 10.1111/j.1748-5827.2012.01265.x. ISBN 10.1111/j.1748-5827.2012.01265.x.

FALLER, Kiterie M.E., Jose BRAS, Samuel J. SHARPE, et al. The Chihuahua dog: A new animal model for neuronal ceroid lipofuscinosis CLN7 disease? *Journal of Neuroscience Research* 2016, 94(4), 339–347 DOI: 10.1002/jnr.23710. ISBN 10.1002/jnr.23710.

FARIA, Roberta Delessa, Alessandra Coelho ZANELLA, Brenda Calmon TAVARES, Guilherme Ferreira BRETAS, Marcelo Renan De Deus SANTOS a Betania Souza MONTEIRO. ANOMALIA DE PELGER-HUËT – RELATO DE CASO. *Archives of Veterinary Science* 2012, 17/4, 10-16 DOI: 10.5380/avs.v17i4.25923. ISBN 10.5380/avs.v17i4.25923.

FARIAS, Fabiana H. G., Gary S. JOHNSON, Jeremy F. TAYLOR, et al. An ADAMTS17 Splice Donor Site Mutation in Dogs with Primary Lens Luxation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010, 51/9, 4716-4721 DOI: 10.1167/iovs.09-5142. ISBN 10.1167/iovs.09-5142.

FYFE, J.C., S.L. HEMKER, P.J. VENTA, B. STEBBING a U. GIGER. Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption with Proteinuria (Imerslund-Gräsbeck Syndrome) in Juvenile Beagles. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014, 2(24), 356-362 DOI: 10.1111/jvim.12284. ISBN 10.1111/jvim.12284.

FYFE, John C., Shelby L. HEMKER, Patrick J. VENTA, Caitlin A. FITZGERALD, Catherine A. OUTERBRIDGE, Sherry L. MYERS a Urs GIGER. An exon 53 frameshift mutation in CUBN abrogates cubam function and causes Imerslund-Gräsbeck syndrome in dogs. *Molecular Genetics and Metabolism* 2013, 109(4), 390-396 DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.05.006. ISBN 10.1016/j.ymgme.2013.05.006.

GANS, Z. Confirmed Trapped Neutrophil Syndrome in a Border Collie Puppy in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2015, 70/2, 45-48

GENOMIA. Pokyny k odběrům zvířecích vzorků. Genomia genetic laboratory [online]. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z: <https://www.genomia.cz/cz/>

GEYER, J., B. DORING, J. R. GODOY, A. MORITZ a E. PETZINGER. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Veterinary journal* 2005, 1(28), 95-99 DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00625.x. ISBN 10.1111/j.1365-2885.2004.00625.x.

GILLIAM, D., A. KOLICHESKI, G.S. JOHNSON, T. MHLANGA-MUTANGADURA, J.F. TAYLOR, R.D. SCHNABEL a M.L. KATZ. Golden Retriever dogs with neuronal ceroid lipofuscinosis have a two-base-pair deletion and frameshift in CLN5. *Molecular genetics and metabolism* 2015, 115, 101-109 DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.04.001. ISBN 10.1016/j.ymgme.2015.04.001.

GOULD, David, Louise PETTITT, Bryan MCLAUGHLIN, et al. ADAMTS17 mutation associated with primary lens luxation is widespread among breeds. *Veterinary ophthalmology* 2011, 14/6, 378-384 DOI: 10.1111/j.1463-5224.2011.00892.x. ISBN 10.1111/j.1463-5224.2011.00892.x.

GRAMER, Irina, Regina LEIDOLF, Barbara DÖRING, Stefanie KLINTZSCH, Eva-Maria KRÄMER, Ebru YALCIN, Ernst PETZINGER a Joachim GEYER. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Veterinary journal* 2011, 2011(189(1), 67-71 DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.06.012. ISBN 10.1016/j.tvjl.2010.06.012.

GUO, Juyuan, Dennis P O'BRIEN, Tendai MHLANGA-MUTANGADURA, Natasha J OLBY, Jeremy F TAYLOR, Robert D SCHNABEL, Martin L KATZ a Gary S JOHNSON. A rare homozygous MFSD8 single-base-pair deletion and frameshift in the whole genome sequence of a Chinese Crested dog with neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Veterinary Research* 2015, 3(10) DOI: 10.1186/s12917-014-0181-z. ISBN 10.1186/s12917-014-0181-z.

HADIDI, A., R. FLORES, J. RANGLES a J. SEMANCIK. *Viroids: Properties, Detection, Diseases and their Control* CSIRO Publishing, 2003 ISBN 0643067892.

HE, Qianchuan, John C. FYFE, Alejandro A. SCHEFFER, Adam KILKENNEY, Petra WERNER, Ewen F. KIRKNESS a Paula S. HENTHORN. Canine Imerslund-Grasbeck syndrome maps to a region orthologous to HSA14q. *Mammalian Genome* 2003, 14(11), 758-764 DOI: 10.1007/s00335-003-2280-1. ISBN 10.1007/s00335-003-2280-1.

HÜLSMEYER, V., R. ZIMMERMANN, C. BRAUER, C. SAUTER-LOUIS a A. FISCHER. Epilepsy in Border Collies: Clinical Manifestation, Outcome, and Mode of Inheritance. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010, 24, 171–178. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0438.x. ISBN 10.1111/j.1939-1676.2009.0438.x.

HYTÖNEN, Marjo K., Meharji ARUMILLI, Anu K. LAPPALAINEN, et al. Molecular Characterization of Three Canine Models of Human Rare Bone Diseases: Caffey, van den Ende-Gupta, and Raine Syndromes. *PLOS Genetics* 2016, 1-20 DOI: 10.1371/journal.pgen.1006037. ISBN 10.1371/journal.pgen.1006037.

HYTÖNEN, Marjo K. a Hannes LOHI. Canine models of human rare disorders. *Rare Diseases* 2016, 4/1, 1-6 DOI: 10.1080/21675511.2016.1241362. ISBN 10.1080/21675511.2016.1241362.

JOHANSSON, B. G. Agarose Gel Electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2009, (29/124), 7-19 DOI: 10.3109/00365517209102747. ISBN 10.3109/00365517209102747.

KATZ, Martin L., Cheryl A. JENSEN, Jeffrey T. STUDENT, Gayle C. JOHNSON a Joan R. COATES. Cervical spinal cord and motor unit pathology in a canine model of SOD1-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2017, (15), 193-203 DOI: 10.1016/j.jns.2017.05.009. ISBN 10.1016/j.jns.2017.05.009.

KIRKNESS, E. F. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. *Science* 2003, (301), 1898-1903 DOI: 10.1126/science.1086432. ISBN 10.1126/science.1086432.

KNICKELBEIN, Kelly E., David J. MAGGS, Christopher M. REILLY, Kathryn L. GOOD a Juliet R. GIONFRIDDO. Multiple ocular developmental defects in four closely related alpacas. *Veterinary Ophthalmology* 2018, 1-8 DOI: 10.1111/vop.12540. ISBN 10.1111/vop.12540.

KOHYAMA, Moeko, Masato KITAGAWA, Hiroaki KAMISHINA, Yui KOBATAKE, Akira YABUKI, Mariko SAWA, Shusaku KAKITA a Osamu YAMATO. Degenerative myelopathy in the Collie breed: a retrospective immunohistochemical analysis of superoxide dismutase 1 in an affected Rough Collie, and a molecular epidemiological survey of the *SOD1*. The Journal of Veterinary Medical Science. 2017, 79(2), 375-379 DOI: 10.1292/jvms.16-0391. ISBN 10.1292/jvms.16-0391.

KOLICHESKI, A., G.S. JOHNSON, D.P. O'BRIEN, et al. Australian Cattle Dogs with Neuronal Ceroid Lipofuscinosis are Homozygous for a CLN5 Nonsense Mutation Previously Identified in Border Collies. Journal of Veterinary Internal Medicine 2016, 4(30), 1149–1158 DOI: 10.1111/jvim.13971. ISBN 10.1111/jvim.13971.

LATIMER, K. S., R. P. CAMPAGNOLI a D. M. DANILENKO. Pelger-Huët Anomaly in Australian Shepherds: 87 Cases (1991-1997). Comparative Haematology International 2000, 10/1, 9-13 DOI: 10.1007/s005800070021. ISBN 10.1007/s005800070021.

LATIMER, K.S., I.M. KIRCHER, P.A. LINDL, D.L. DAWE a J. BROWN. Leukocyte function in Pelger-Huët anomaly of dogs. Journal of Leukocyte Biology 1989, 45(4)

LIGHTFOOT, R.M, L CABRAL, L GOOCH, P.G.C BEDFORD a M.E BOULTON. Retinal pigment epithelial dystrophy in Briard dogs. Research in Veterinary Science 1996, 60/1 DOI: 10.1016/S0034-5288(96)90124-1. ISBN 10.1016/S0034-5288(96)90124-1.

LUKASZEWSKA, Janina, Robin W ALLISON a Julita STEPKOWSKA. Congenital Pelger-Huët anomaly in a Danish/Swedish Farmdog: Case Report. Acta Veterinaria Scandinavica 2011, 53(1), 14- DOI: 10.1186/1751-0147-53-14. ISSN 1751-0147.

LUTZ, Sabina, Adrian C. SEWELL, Claudia E. REUSCH a Peter H. KOOK. Clinical and Laboratory Findings in Border Collies with Presumed Hereditary Juvenile Cobalamin Deficiency. Journal of the American Animal Hospital Association 2013, 49(3), 197-203 DOI: 10.5326/JAAHA-MS-5867. ISBN 10.5326/JAAHA-MS-5867.

MAEHARA, Seiya, Yoshiki ITOH, Sho HOSHINO, Miri HAYASHI a Yosuke ITO. Dark adaptation time in canine electroretinography using a contact lens electrode with a built-in light source. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2015, 77/10, 1335–1338 DOI: 10.1292/jvms.14-0647. ISBN 10.1292/jvms.14-0647.

MAREK, Jan. Možnosti využití výrobků firmy Shimadzu v oborech biotechnologických, biochemických a ve farmacii. *CHEMAGAZÍN* 2011, 21/5, 28-29

MASON, S. L., R. JEPSON, M. MALTMAN a D. J. BATCHELOR. Presentation and management of trapped neutrophil syndrome (TNS) in UK border collies. *Journal of Small Animal Practice* 2014, 55/14, 57-60 DOI: 10.1111/jsap.12134. ISBN 10.1111/jsap.12134.

MAURER, Marie, Jérôme MARY, Laurent GUILLAUD, et al. Centronuclear Myopathy in Labrador Retrievers: A Recent Founder Mutation in the PTPLA Gene Has Rapidly Disseminated Worldwide. *PLOS one* 2012, 7/10 DOI: 10.1371/journal.pone.0046408. ISBN 10.1371/journal.pone.0046408.

MEALEY, Katrina L., Kylie A. MUNYARD a Steven A. BENTJEN. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary journal* 2005, (131), 193-196 DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.05.004. ISBN 10.1016/j.vetpar.2005.05.004.

MELLERSH, Cathryn S. The genetics of eye disorders in the dog. *H Canine Genetics and Epidemiology* 2014, 1/3 DOI: 10.1186/2052-6687-1-3. ISBN 10.1186/2052-6687-1-3.

MELVILLE, S, C WILSON, C CHIANG, V STUDDERT, F LINGAAS a A WILTON. A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs☆. *Genomics* 2005, 3(86), 287-294 DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.06.005. ISBN 10.1016/j.ygeno.2005.06.005.

MIZUKAMI, Keijiro, Tomoaki SHOUBUDANI, Seira NISHIMOTO, Ryuta KAWAMURA, Akira YABUKI a Osamu YAMATO. Trapped Neutrophil Syndrome in a Border Collie Dog: Clinical, Clinico-Pathologic, and Molecular Findings. *Veterinary Medicine and Science* 2011, 74/6, 797–800 DOI: 10.1292/jvms.11-0472. ISBN 10.1292/jvms.11-0472.



MIZUKAMI, K., A. YABUKI, D. ENDOH, et al. Investigation of parallel and simultaneous selection for collie eye anomaly and ivermectin toxicosis. *Veterinary Records* 2013, 16-23 DOI: 10.1136/vr.102015. ISBN 10.1136/vr.102015.

MULLIS, KARY B. a FRED A. FALOONA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. ACADEMIC PRESS 1989, 1989, , 189–204 DOI: 10.1016/B978-0-12-765560-4.50015-0. ISBN 10.1016/B978-0-12-765560-4.50015-0.

NARDONE, Raffaele, Yvonne HÖLLER, Alexandra C. TAYLOR, Piergiorgio LOCHNER, Frediano TEZZON, Stefan GOLASZEWSKI, Francesco BRIGO a Eugen TRINKA. Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology* 2016, 1(119), 64-73 DOI: 10.1016/j.zool.2015.09.003. ISBN 10.1016/j.zool.2015.09.003.

O'BRIEN, Peter J. Canine Malignant Hyperthermia/Canine Stress Syndrome. *Malignant Hyperthermia: A Genetic Membrane Disease*. 1. CRC Press, 1993, s. 106-108. ISBN 9780849380938.

OLIVE, D.M. a P. BEAN. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 1999, 37/6, 1661–1669

OLIVER, James A. C., Oliver P. FORMAN, Louise PETTITT, Cathryn S. MELLERSH a Ted S ACOTT. Two Independent Mutations in ADAMTS17 Are Associated with Primary Open Angle Glaucoma in the Basset Hound and Basset Fauve de Bretagne Breeds of Dog: Two Independent Mutations in ADAMTS17 Are Associated with Primary Open Angle Glaucoma in the Basset Hound and Basset Fauve de Bretagne Breeds of Dog. *PLOS one* 2015, 16/10 DOI: 10.1371/journal.pone.0140436. ISBN 10.1371/journal.pone.0140436.

OSTRANDER, E. A. The canine genome. *Genome research* 2005, 15(12), 1706-1716 DOI: 10.1101/gr.3736605. ISBN 10.1101/gr.3736605.

OSTRANDER, Elaine A., Robert K. WAYNE, Adam H. FREEDMAN a Brian W. DAVIS. Demographic history, selection and functional diversity of the canine genome. *Nature Reviews Genetics* 2017, 18(12), 705-720 DOI: 10.1038/nrg.2017.67. ISBN 10.1038/nrg.2017.67.

OWCZAREK-LIPSKA, Marta, Vidhya JAGANNATHAN, Cord DRÖGEMÜLLER, Sabina LUTZ, Barbara GLANEMANN, Tosso LEEB, Peter H. KOOK a Claire WADE. A Frameshift Mutation in the Cubilin Gene (CUBN) in Border Collies with Imerslund-Gräsbeck Syndrome (Selective Cobalamin Malabsorption). PLoS ONE 2013, 8(16) DOI: 10.1371/journal.pone.0061144. ISBN 10.1371/journal.pone.0061144.

PALANOVA, A. Collie eye anomaly: a review. Veterinarni Medicina 2015, 60/7, 345–350 DOI: 10.17221/8381-VETMED. ISBN 10.17221/8381-VETMED.

PALDUSOVÁ, M. Anomálie očí u kolií (CEA). Brno, 2011. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. P. Bartoňová.

PARKER, Heidi G., Dayna L. DREGER, Maud RIMBAULT, Brian W. DAVIS, Alexandra B. MULLEN, Gretchen CARPINTERO-RAMIREZ a Elaine A. OSTRANDER. Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development. Cell reports 2017, 19(4), 697-708 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.079. ISBN 10.1016/j.celrep.2017.03.079.

PELÉ, Manuel, Laurent TIRET, Jean-Louis KESSLER, Stéphane BLOT a Jean-Jacques PANTHIER. SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. Human Molecular Genetics 2005, 14/11, 1417–1427 DOI: 10.1093/hmg/ddi151. ISBN 10.1093/hmg/ddi151.

PFAHLER, S., N. BACHMANN, C. FECHLER, C. LEMPP, W. BAUMGÄRTNER a O. DISTL. Degenerative myelopathy in a SOD1 compound heterozygous Bernese mountain dog. Animal genetics 2013, 309-310 DOI: 10.1111/age.12118. ISBN 10.1111/age.12118.

ROBERTS, Monica C., James R. MICKELSON, Edward E. PATTERSON, Thomas E. NELSON, P. Jane ARMSTRONG, David B. BRUNSON a Kirk HOGAN. Autosomal Dominant Canine Malignant Hyperthermia Is Caused by a Mutation in the Gene Encoding the Skeletal Muscle Calcium Release Channel (RYR1). Anesthesiology 2001, 9/95, 716-725

RUSBRIDGE, Clare. Canine idiopathic epilepsy. *Veterinary Ireland Journal* 2016, 6/5, 269-278

SAVOLAINEN, P. Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. *Science* 2002, (298), 1610-1613 DOI: 10.1126/science.1073906. ISBN 10.1126/science.1073906.

SEPPÄLÄ, Eija H., Tarja S. JOKINEN, Masaki FUKATA, et al. LGI2 Truncation Causes a Remitting Focal Epilepsy in Dogs. *PLOS Genetics* 2011 DOI: 10.1371/journal.pgen.1002194. ISBN 10.1371/journal.pgen.1002194.

SHEARMAN, Jeremy R a Alan N WILTON. A canine model of Cohen syndrome: Trapped Neutrophil Syndrome. *BMC Genomics* 2011, 12 DOI: 10.1186/1471-2164-12-258. ISBN 10.1186/1471-2164-12-258.

SHELTON, G. Diane, Gayle C. JOHNSON, Dennis P. O'BRIEN, Martin L. KATZ, Jill P. PESAYCO, Brian J. CHANG, Andrew P. MIZISIN a Joan R. COATES. Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh Corgis and Boxers. *Journal of the Neurological Sciences* 55-64 DOI: 10.1016/j.jns.2012.04.003. ISBN 10.1016/j.jns.2012.04.003.

SUTTER, Nathan B. a Elaine A. OSTRANDER. Dog star rising: the canine genetic system. *Nature Reviews Genetics* 2004, (5(12)), 900-910. DOI: 10.1038/nrg1492. ISBN 10.1038/nrg1492.

ŠIMERDOVÁ V., CEPLECHA V., HONAJZEROVÁ P., HÁJEK I., AGUDELO C.F. a TŠPONO VÁ Z. Pelger-Huëtova anomálie australského ovčáka – popis případu. *VETERINÁŘSTVÍ* 2014, 2014(10)

ŠKROBÁNKOVÁ, Michaela. Určování paternity u psů. Brno, 2006. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická universita v Brně. Vedoucí práce Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.

TIRET, Laurent, Stephane BLOT, Jean-Louis KESSLER, Hugues GAILLOT, Matthew BREEN a Jean-Jacques PANTHIER. The cnm locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Human Genetics* 2003, 113/4, 297–306 DOI: 10.1007/s00439-003-0984-7. ISBN 10.1007/s00439-003-0984-7.

TOEDEBUSCH, C.M., M.D. BACHRACH, V.B. GARCIA, G.C. JOHNSON, M.L. KATZ, G. SHAW, J.R. COATES a M.L. GARCIA. Cerebrospinal Fluid Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy as a Diagnostic Marker of Canine Degenerative Myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2017, (31(2), 513–520 DOI: 10.1111/jvim.14659. ISBN 10.1111/jvim.14659.

TRÝZNOVÁ, ALENA. Geneticky determinované choroby u border kolií. Brno, 2014. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph. D.

VALE, A. M., L. R. TOMAZ, R. S. SOUSA a B. SOTO-BLANCO. Pelger-Huet anomaly in two related mixed-breed dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011, 23(4), 863-865 DOI: 10.1177/1040638711407891. ISSN 1040-6387.

VILBOUX, Thierry, Gilles CHAUDIEU, Patricia JEANNIN, et al. Progressive Retinal Atrophy in the Border Collie: A new XLPRA. *BMC Veterinary Research* 2008, 4/10 DOI: 10.1186/1746-6148-4-10. ISBN 10.1186/1746-6148-4-10.

VOJTOVÁ, Magda. Optimalizace parametrů polymerázové řetězové reakce. České Budějovice, 2013. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Mgr. Jaroslava Kohoutová, Ph.D.

VOLNÁ, Jitka. Genetická analýza vybrané dědičné choroby u psů. České Budějovice, 2016. Diplomová práce. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Vedoucí práce Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

WALSH, P. S., D. A. METZGER a R. HIGUCHI. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 1991, 10/4, 506-513

WHYTE, Michael P, William H MCALISTER, Michael D FALLON, et al. Raine Syndrome (OMIM #259775), Caused By FAM20C Mutation, Is Congenital Sclerosing Osteomalacia With Cerebral Calcification (OMIM 259660). *Journal of Bone and Mineral Research* 2017, 32/4, 757–769 DOI: 10.1002/jbmr.3034. ISBN 10.1002/jbmr.3034.

WILEY, John. Degenerative Myelopathy (a Spinal Cord Disease). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Canine and Feline*, 2011

WOUDA, R.M., T.J. KING a B.M. MACKAY. Long-term management of trapped neutrophil syndrome in two Border Collies. Australian Veterinary Practitioner 2010, 40/2, 58-63

YANG, Tiazhong, Joyce RIEHL, Eric ESTEVE, Klaus MATTHAEI, Samuel GOTH, Isaac N. PESSAH a José R. LOPEZ. Pharmacologic and Functional Characterization of Malignant Hyperthermia in the R163C RyR1 Knock-in Mouse. Anesthesiology 2006, 12/105, 1164-1175

ZENG, R., J.R. COATES, G.C. JOHNSON, et al. Breed Distribution of SOD1 Alleles Previously Associated with Canine Degenerative Myelopathy. The Journal of Veterinary Medical Science 2014, 28(2), 515-521 DOI: 10.1111/jvim.12317. ISBN 10.1111/jvim.12317.

## **11. Seznam použitých tabulek**

- Tab. 1: Použité teplotní profily
- Tab. 2: Použité primery
- Tab. 3: Složení PCR reakce
- Tab. 4: Složení RFLP reakce
- Tab. 5: Frekvence genotypů a alel u analyzované skupiny psů
- Tab. 6: Optimalizace použitých teplotních profilů
- Tab. 7: Teploty nasedání primerů

## 12. Seznam použitých obrázků

- Obr. 1:           Specifický plíživý pohyb border kolie
- Obr. 2:           Typ Herdman's Tommy
- Obr. 3:           Typ Nap
- Obr. 4:           Rozdělení psích plemen na základě molekulární analýzy
- Obr. 5:           Úrovně LP u vybraných plemen psů
- Obr. 6:           Sekvence aminokyselin pro gen *VPS13B*
- Obr. 7:           Sekvence aminokyselin pro gen *CUBN*
- Obr. 8:           Detekce delece genu *MDR1*
- Obr. 9:           Schéma funkce Pgp
- Obr. 10:          Sekvence aminokyselin pro gen *FAM20C*
- Obr. 11:          Teplotní gradient
- Obr. 12:          Výsledek gelové a mikročipové elektroforézy pro TNS
- Obr. 13:          Výsledek gelové elektroforézy pro MDR1
- Obr. 14:          Výsledek PCR-RFLP analýzy pro MDR1
- Obr. 15:          Výsledek PCR-RFLP analýzy pro IGS

### 13. Seznam použitých zkratek

|         |  |
|---------|--|
| BOC     | border kolie; border collie  |
| Cbl     | kobalamin; cobalamin   |
| CEA     | anomálie oka kolií; collie eye anomaly                                   |
| CMN     | centronukleární myopatie; cetronuclear myopathies                        |
| ČMKU    | Českomoravská kynologická unie   |
| DKK     | dysplazie kyčelního kloubu   |
| DLK     | dysplazie loketního kloubu   |
| DM      | degenerativní myelopatie; degenerative myelopathy                        |
| FCI     | Mezinárodní kynologická federace;<br>Fédération Cynologique Internationa |
| IE      | idiopatická epilepsie; idiopathic epolepsy                               |
| ISDS    | Mezinárodní asociace ovčáckých psů; Internation SheepDog Society         |
| LD      | vazebná nerovnováha; linkage disequilibrium                              |
| MDR1    | mnohočetná léková resistance; mutidrug resistance                        |
| MH      | maligní hypertermie; malignant hyperthermia                              |
| NCL     | neuronální ceroidní lipofuscinóza; neuronal ceroid lipofuscinosis        |
| OFA     | Orthopedic Foundation for Animals  |
| PCR     | polymerázová řetězová reakce; polymerase chain reaction                  |
| PG      | primární glaukom; primary glaucoma                                       |
| Pgp     | P-glykoprotein   |
| PHA     | Pelger–Huëtova anomálie; Pelger–Huët anomaly                             |
| PK ČMKU | plemenná kniha Českomoravské kynologické unie                            |
| PPL     | primární luxace čočky; primary lens luxation                             |



|      |  |
|------|--|
| PRA  | progresivní atrofie sítnice; progressive retinal athrophy    |
| RFLP | restrikční analýza; restriction fragment length polymorphism |
| RS   | dentální hypomineralizace; Raine syndrome                    |
| TNS  | syndrom uvězněných neutrofilů; trapped neutrophil syndrome   |

## 14. Příloha 1:

### INFORMAČNÍ DOTAZNÍK

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Jméno majitele:</b>            |                                   |
| <b>Datum a čas stěru:</b>         |                                   |
| <b>Jméno psa:</b>                 |                                   |
| <b>Věk psa:</b>                   |                                   |
| <b>Pohlaví psa:</b>               |                                   |
| <b>Číslo zápisu ČMKU:</b>         |                                   |
| <b>Import psa – příp. odkud:</b>  | ANO / NE                          |
| <b>Linie psa:</b>                 | Výstavní / Pracovní               |
| <b>Pes dříve testován – TNS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Pes dříve testován – MDR1:</b> | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Pes dříve testován – IGS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |

|                             |                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Otec psa:</b>            |                                   |
| <b>Pes testován – TNS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Pes testován – MDR1:</b> | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Pes testován – IGS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |

|                               |                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Matka psa:</b>             |                                   |
| <b>Fena testována – TNS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Fena testována – MDR1:</b> | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |
| <b>Fena testována – IGS:</b>  | ANO / NE<br>Pozitivní / Negativní |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Kontaktní e-mail majitele:</b> |  |
|-----------------------------------|--|