

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra Genetiky a šlechtění**



**Česká  
zemědělská  
univerzita  
v Praze**

**Polymorfismus kandidátních genů  
imunitního systému skotu a jeho vztah  
k funkčním znakům**

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Ladislav Tichý  
Školitel: prof. Ing. Luboš Vostrý, Ph.D.  
Konzultant: Dr. Ing. Jitka Kyselová  
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

Praha 2023

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou doktorskou disertační práci s názvem „Polymorfismus kandidátních genů imunitního systému skotu a jeho vztah k funkčním znakům“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího a konzultanta disertační práce. Při psaní disertační práce byly dodrženy postupy pro práci s odbornou literaturou a informačními zdroji nařízené univerzitou. Všechny použité zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury a v souvislosti s citováním nebyla porušena autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.8.2023

---

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svojí rodině a přítelkyni za podporu a oporu, kterou mi během studia poskytovali. Velký dík patří vedoucímu disertační práce prof. Ing. Luboši Vostrému, Ph.D. a konzultantce Dr. Ing. Jitce Kyselové za odborné vedení a konzultování disertační práce. Také bych rád poděkoval Ing. Ludmile Zavadilové, CSc. za konzultace statistických výpočtů. Dále bych rád poděkoval celé Katedře genetiky a šlechtění za možnost konzultací během studia a také celému oddělení Genetiky a šlechtění Výzkumného ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi za velké množství rad a předaných zkušeností. Rád bych také poděkoval Českomoravské společnosti chovatelů a.s. za možnost spolupráce a poskytnutí datových souborů.

Disertační práce byla financována z projektu Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZE-RO 0718.

## Abstrakt

Receptory imunitních buněk hrají klíčovou roli při napadení organismu infekčním patogenem. Do této skupiny patří bílkovinné Toll-like receptory, které rozpoznávají široké spektrum pro organismus nebezpečných struktur. Disertační práce se zabývala vztahem mezi jednonukleotidovými polymorfismy v genech těchto receptorů a jejich signálních drah a funkčními znaky skotu. V první části byla studována variabilita v genu *IRAK1* za pomoci technologií Sangerova sekvenování a DNA čipů. Sekvenování regionů odhalilo přítomnost SNP rs480726521 a rs210710958. Technologie DNA čipů byla použita pro stanovení alelických frekvencí polymorfismu rs110533802 pro 10 492 zvířat u 6 plemen skotu. Významně vyšší frekvence mutované alely u dojných plemen vedla k hypotéze o asociaci SNP se znaky mléčné užitkovosti. K odhadu této potenciální asociace u 1016 holštýnských dojnic byl použit statistický model GLM. Statisticky významné výsledky byly nalezeny pro skóre somatických buněk na první ( $p = 0,0436$ ) a druhé laktaci ( $p = 0,0135$ ), hloubku vemene ( $p = 0,0001$ ), celkový znak hodnocení vemene ( $p = 0,0202$ ), kondici ( $p = 0,0047$ ), hranatost ( $p = 0,0450$ ), rámec ( $p = 0,0134$ ) a úhel paznehtu ( $p = 0,0283$ ). Pro detekci 10 SNP v genu *TLR2* byla použita metoda extenze primeru SNaPshot (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) pro 823 dojnic Českého strakatého skotu (ČESTR). Z aplikace Deník nemocí a léčení (Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves) byla sbírána data o výskytu mastitidy. Ve studované populaci byla objeveny absolutní genové vazby mezi polymorfismy a pro tyto skupiny byly nalezeny statisticky významné rozdíly pro heterozygotní genotypy ve výskytu mastitidy na první a druhé laktaci. Pro polymorfismus rs43706434 byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi původním homozygotním genotypem *CC* a heterozygotním genotypem *CT*. V rámci práce byla také navržena a optimalizována sada pro detekci polymorfismů rs29017188 a rs8193069 v genu *TLR4* metodou PCR-HRM. V poslední části byl monitorován výskyt původců mastitid na experimentální farmě Netluky metodou Real-time PCR u dojnic ČESTR. Během screeningu bylo prověřeno 280 vzorků mléka, při kterých byla odhalena nejčastěji přítomnost *Corynebacterium bovis* (92), *Staphylococcus aureus* (34), *Streptococcus uberis* (8) a třech dalších bakteriálních patogenů.

Klíčová slova: SNP, genotypování, vrozená imunita, mastitida, diverzita

## Abstract

Immune cell receptors play a key role when an organism is attacked by infectious pathogens. This group includes protein Toll-like receptors that recognize a wide spectrum of dangerous structures within the organism. The PhD thesis focused on exploring the relationship between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of these receptors and their signaling pathways and functional traits in cattle. The first part of the study examined the variability in the *IRAK1* gene using Sanger sequencing and DNA microarray technologies. Sequencing of the regions revealed the presence of SNPs rs480726521 and rs210710958. DNA chip technology was utilized to determine the allelic frequencies of the rs110533802 polymorphism in 10,492 animals from 6 different breeds of cattle. The significantly higher frequency of the mutant allele in dairy breeds raised the hypothesis of an association between these SNPs and milk yield traits. To explore this potential association, a GLM statistical model was applied to 1016 Holstein dairy cows, yielding statistically significant results for first ( $p = 0.0436$ ) and second lactation somatic cell scores ( $p = 0.0135$ ), udder depth ( $p = 0.0001$ ), total udder score ( $p = 0.0202$ ), body condition score ( $p = 0.0047$ ), angularity ( $p = 0.0450$ ), stature ( $p = 0.0134$ ), and hoof angle ( $p = 0.0283$ ). Next, the study focused on detecting 10 SNPs in the *TLR2* gene using the SNaPshot primer extension method (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) in 823 dairy cows of the Czech Fleckvieh Cattle (ČESTR) breed. Data on the occurrence of mastitis were collected from the "Diary of Diseases and Treatments" (Institute of Animal Science, Uhřetěves, Prague). The study revealed absolute gene linkage between the polymorphisms studied and statistically significant differences were found for heterozygous genotypes in the occurrence of mastitis during the first and second lactation. For the rs43706434 polymorphism, a statistically significant difference was found between the original homozygous *CC* genotype and the *CT* heterozygous genotype. Furthermore, the study designed and optimized a kit for the detection of rs29017188 and rs8193069 polymorphisms in the *TLR4* gene using the PCR-HRM method. Lastly, the occurrence of mastitis-causing agents at the Netluky experimental farm was monitored using the Real-time PCR method in ČESTR dairy cows. A total of 280 milk samples were examined, with *Corynebacterium bovis* (92), *Staphylococcus aureus* (34), *Streptococcus uberis* (8), and three other bacterial pathogens being the most frequently detected.

Key words: SNP, genotyping, innate immunity, mastitis, diversity

## Obsah

1 Úvod .....	8
2 Literární přehled .....	9
2.1 Jedno-nukleotidový polymorfismus (SNP) ve vztahu k infekčním onemocněním .....	9
2.2.1 Imunitní systém savců .....	9
2.2.2 Vrozená imunita savců .....	10
2.3 Toll-like receptory.....	11
2.3.1 Toll-like receptor 2 .....	14
2.3.2 Toll-like receptor 4 .....	16
2.3.3 Variabilita v genech TLR receptorů .....	17
2.3.4 Polymorfismu genů Toll-like receptorů ve vztahu k funkčním znakům .....	18
2.5 Signální dráhy Toll-like receptorů.....	19
2.5.1 IRAK 1 .....	21
2.6 Plemeno Český strakatý skot.....	23
2.6.1 Charakteristika plemene .....	23
2.6.2 Historie plemene .....	23
2.6.3 Chovný cíl a standard plemene .....	24
2.7 Molekulárně genetické metody .....	25
2.7.1 Polymerázová řetězová reakce .....	25
2.7.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....	27
2.7.3 Sangerovo sekvenování.....	29
2.7.4 Analýza křivky tání při vysokém teplotním rozlišení .....	31
2.7.5 DNA čipy .....	32
2.8 Molekulární genetika ve šlechtění zvířat.....	34
2.8.1 QTL a MAS .....	35
2.8.2 Genomická selekce .....	35
2.9 Mastitida.....	36
2.9.1 Počet somatických buněk a skóre somatických buněk .....	38
2.9.2 Původci mastitidy .....	40
2.9.2.1 <i>Staphylococcus spp.</i> .....	40
2.9.2.2 <i>Corynebacterium bovis</i> .....	41
2.9.2.3 <i>Mycoplasma spp.</i> .....	41
2.9.2.4 <i>Enterococcus spp.</i> .....	42
2.9.2.5 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....	43
2.9.2.6 <i>Streptococcus uberis</i> .....	43
2.9.2.7 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	43

2.9.2.8 <i>Escherichia coli</i> .....	44
2.9.2.9 <i>Prototheca spp.</i> .....	45
2.9.2.10 <i>Klebsiella spp.</i> .....	45
2.9.2.11 <i>Trueperella pyogenes</i> a <i>Peptoniphilus indolicus</i> .....	46
2.9.2.12 Kvasinky .....	46
2.9.2.13 <i>Serratia marcescens</i> .....	47
3 Vědecké hypotézy a cíl práce .....	48
3.1 Vědecké hypotézy: .....	48
3.2 Cíl práce: .....	48
3.3 Místo řešení:.....	48
4 Materiál a metodika .....	49
4.1 Odběr vzorků a izolace DNA .....	49
4.2 Sangerovo sekvenování genu <i>IRAK1</i> .....	50
4.3 Studium populační variability polymorfismu rs110533802 za použití metody DNA čipů.....	52
4.4 Odhad efektu polymorfismu rs110533802 k funkčním znakům skotu .....	52
4.5 Detekce polymorfismů v genu <i>TLR2</i> pomocí metody SNaPsHot.....	53
4.6 Stanovení populačních charakteristik polymorfismů v genu <i>TLR2</i> .....	55
4.7 Vyhodnocení efektu polymorfismů .....	55
4.8 Návrh a optimalizace metody HRM pro polymorfismy rs29017188 a rs8193069 v genu <i>TLR4</i> .....	56
4.9 Stanovení původců mastitid v mléce dojníc ČESTR na experimentální farmě Netluky.....	58
4.9.1 Izolace bakteriální DNA .....	59
4.9.2 Detekce původců mastitidy metodou qPCR.....	59
5. Výsledky a diskuze .....	60
5.1 Odběr vzorků a izolace DNA .....	60
5.2 Sangerovo sekvenování genu <i>IRAK1</i> .....	62
5.3 Studium populační variability polymorfismu rs110533802 za použití metody DNA čipů.....	63
5.4 Odhad efektu polymorfismu rs110533802 na funkční znaky skotu.....	66
5.5 Detekce polymorfismů v genu <i>TLR2</i> pomocí metody SNaPsHot.....	70
5.6 Stanovení populačních charakteristik polymorfismů v genu <i>TLR2</i> .....	71
5.7 Vyhodnocení efektů polymorfismu .....	75
5.8 Návrh a optimalizace metody HRM pro polymorfismy rs29017188 a rs8193069 v genu <i>TLR4</i> .....	78
5.9 Stanovení původců mastitid v mléce dojníc ČESTR na experimentální farmě Netluky.....	82
6. Závěr a doporučení pro praxi a výzkum .....	86
Reference .....	88

## 1 Úvod

Zánět mléčné žlázy způsobuje velké ekonomické ztráty v důsledku snížení dojivosti, kontaminace mléka nevhodného ke spotřebě a předčasnému utracení zvířete. Navzdory snaze o prevenci, kontrolu a léčbu mastitidy je i nadále mastitida jednou z nejčastějších onemocnění dobytka.

Ve šlechtění dojného skotu byl dříve hlavní cíl především zvyšování užitkovosti, který vedl k vysoké zátěži organismu zvířete a zhoršování jeho zdravotních a reprodukčních vlastností. V současnosti funkční vlastnosti jako je plodnost, dlouhověkost a zdravotní stav se považují za významný faktor rentability v moderních chovech skotu s vysokými nároky na užitkovost a jsou při šlechtění stále více zohledňovány. V případě ztráty zvířete z důvodu nevýhodné genetické výbavy s ohledem na jeho zátěžovou odolnost přichází geneticky založené předpoklady pro vysokou užitkovost vniveč.

Výběr odolnějších zvířat se jeví jako vhodný boj proti infekčním onemocněním jako je například zánět mléčné žlázy. Imunitní systém představuje několik tisíc genů (až 9% genomu) a bylo prokázáno, že schopnost efektivnější imunitní odpovědi a zvýšené odolnosti je dědičná. Imunitní odpověď je integrální součástí celého neuroendokrinního systému a ovlivňuje tak nejen ukazatele fitness, ale i parametry užitkovosti, a to jak mléčné, tak masné.

Vrozená imunita je první linií při napadení organismu infekčním patogenem a je aktivována hned při prvním kontaktu s cizorodou látkou. Klíčovou roli zde hrají receptory imunitních buněk, které mají za úkol rozpoznávat široká spektra patogenů napadající savčí organismus. Mezi tyto receptory patří Toll-like receptory. Jedná se o velkou rodinu receptorů, které rozpoznávají široké spektrum patogenních částic. V mnoha publikacích jsou tyto receptory označovány jako kandidátní v boji proti infekčním onemocněním jako je mastitida. Po aktivaci receptoru dochází ke spuštění signálních drah, na jejichž konci dochází k aktivování obranných mechanismů hostitele. Geny TLR a signálních drah jsou kódovány v zárodečné linii.

Cílem práce bylo analyzovat genetickou variabilitu těchto genů a odhadnout vliv na ukazatele zdraví u vybrané populace dojnic Českého strakatého skotu.



## 2 Literární přehled

### 2.1 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) ve vztahu k infekčním onemocněním

Existuje celá řada faktorů, které mohou ovlivnit průběh onemocnění. Pokrok v genotypizačních technikách a bioinformatice za poslední dobu ukázal důležitou roli genetického založení napadeného organismu při určování dopadu infekce na organismus. Lidský genom obsahuje více než tři miliardy párů bází podobně jako genom skotu, který obsahuje přibližně 2,9 miliard páru bází. Ve většině případů je v rámci druhu většina bází stejná, avšak na genetické úrovni existuje v populaci velké množství variant. Genetické poruchy jsou způsobeny dědičností defektních genů, nicméně existují různé důkazy o spojení určitých genetických variací, které mohou zvýšit náchylnost jednotlivce k určitým infekčním onemocněním. Při zvažování takových zpráv je nutné brát v potaz to, že náchylnost k infekcím se jen zřídka řídí mendelovskou dědičností (Jiang et al. 2003, Jiang et al. 2004).

Genetické polymorfismy mohou být děděny a přenášeny evolučním tlakem, nebo mohou být způsobeny faktory prostředí. Tyto mutace mohou ovlivnit imunitní regulaci a tím ovlivnit také výsledek onemocnění. Jednonukleotidové polymorfismy – Single nucleotide polymorphism (SNP) jsou nejčastějším typem genetických variací v populaci (Compton et al. 2003).

SNP je změna jedné báze v sekvenci DNA s obvyklou alternativou dvou možných nukleotidů v dané poloze. Mutační mechanismy vedou k tranzicím: záměna purinu za purin (A – G) a pyrimidinu za pyrimidin (C – T), nebo k transverzím: purin – pyrimidin, nebo pyrimidin – purin (A-C, A-T, G -C, G -T). Záměnu báze můžeme považovat za SNP, pokud je méně častá alela v populaci s frekvencí 1 % a vyšší. I když v principu může být přítomna jakákoliv ze čtyř možných nukleotidových bází, SNP jsou v praxi obvykle bialelické. Jedním z důvodů je nízká frekvence jednonukleotidových substitucí na počátku SNP, která se odhaduje mezi  $1 \times 10^{-10}$  až  $5 \times 10^{-9}$  na nukleotid za rok na neutrálních pozicích u savců a tedy pravděpodobnost dvou změn, ke kterým dojde na jedné pozici, je velmi nízká (Vignal et al. 2002).

#### 2.2.1 Imunitní systém savců

Obrana hostitele proti invazním mikrobiálním patogenům je vyvolána imunitním systémem, který je složen ze dvou složek: vrozená a získaná imunita. Obě složky imunity

rozpoznávají napadající organismy jako nevlastní a dochází ke spuštění imunitních reakcí, které mají za úkol odstranění patogenu z organismu.

Získaná imunita se skládá z buněčné složky (B-lymfocyty, T-lymfocyty) a humorální složky (protilátky, cytokiny), přičemž využívá klonální selekce z velkého počtu lymfocytů nesoucí antigen specifické receptory. B-lymfocyty a T-lymfocyty využívají pro rozpoznávání patogenu receptory jako např. imunoglobuliny a receptory T-buněk. Po kontaktu antigenu s receptorem dochází ke zmnožení buněk (Parker 1993; Takeda a Akira 2005).

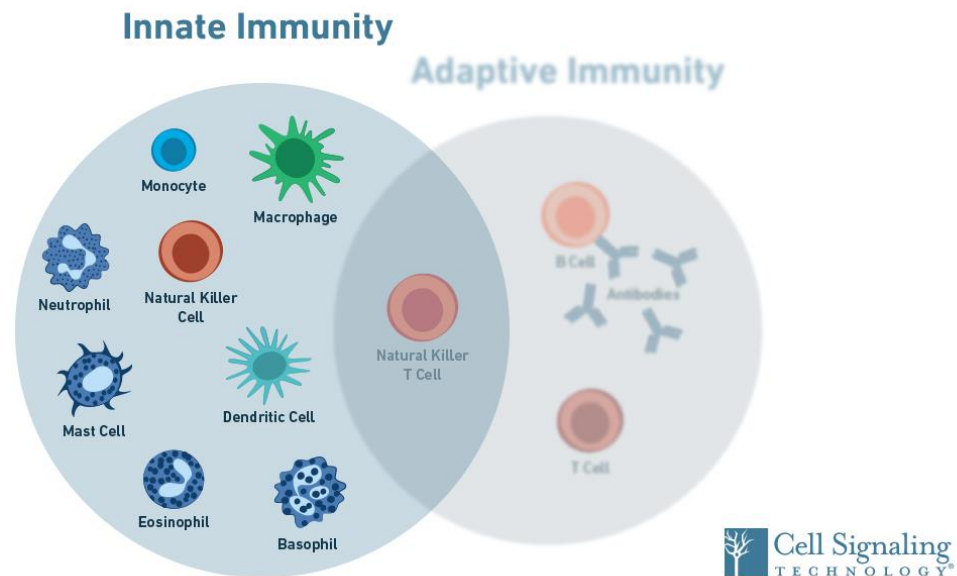
Buňky získané imunity jsou diferenciovány z lymfoidních progenitorů v kostní dřeni. Následně se mění na paměťové B-lymfocyty a poté velká část dozrává v plazmatické buňky a následně dochází k syntéze protilátek (Parker 1993; Pancer a Cooper 2006).

Antigenová specifita umožňuje generování odpovědí, které jsou přizpůsobeny specifickým patogenům, nebo patogenem infikovaným buňkám. Schopnost vytvořit tyto přizpůsobené reakce je udržováno v těle savců paměťovými B-lymfocyty. Pokud patogen infikoval tělo více než jednou, jsou tyto specifické paměťové buňky použity k jeho rychlé likvidaci (Sompayrac 2019).

Oproti tomu vrozená imunita má schopnost reagovat na patogen okamžitě už při prvním kontaktu. Jakmile dojde k navázání antigenu na receptor dochází k přenosu signálu v buňce. Začíná syntéza obranných látek (cytokinů), které do místa kontaktu s patogenem přivolávají další imunitní buňky a dochází k zánětu (Delves a Roitt 2000).

### **2.2.2 Vrozená imunita savců**

Vrozený imunitní systém spoléhá na omezený počet receptorů pro detekci invazních patogenů. Tyto receptory se nazývají vzory rozpoznávající receptory (Pattern recognition receptors, PRRs). Tento omezený počet receptorů je kompenzován zacílením na konzervované mikrobiální složky – patogeny asociované molekulární vzory (patogen-associated molecular patterns, PAMPs), které jsou sdíleny velkými skupinami patogenů (Stuart et al. 2010). PAMPs jsou kritické pro přežití a patogen je může obtížně měnit.



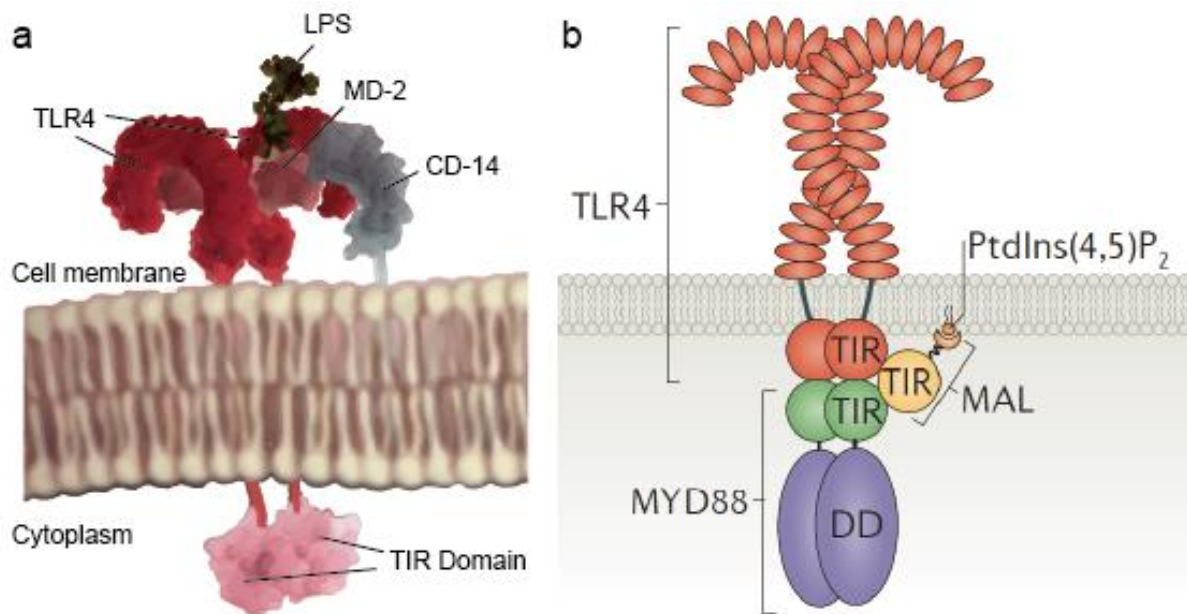
Obrázek 1 – Rozdělení imunitních buněk dle Vrozené (vlevo) a Získané imunity (vpravo) (<https://blog.cellsignal.com/immunology-how-does-the-innate-immune-system-work>)

Tyto receptory jsou kódované v zárodečné linii a nacházejí se v buňkách imunitního systému (makrofágy, monocyty, neutrofil, dendritické buňky, epitelální buňky) (Akira et al. 2006; Schroder a Tschopp 2010).

Rychlost je definující charakteristikou vrozeného imunitního systému. Během několika minut po expozici patogenu, vrozený imunitní systém začne vytvářet ochrannou zánětlivou reakci. Kromě toho hraje vrozený imunitní systém ústřední roli při aktivaci následné adaptivní imunitní reakce (Stuart et al. 2010).

### 2.3 Toll-like receptory

V dnešní době je známo 12 členů skupiny TLR u savců. Jedná se o integrální membránové glykoproteiny typu I. Toll-like receptory – receptory podobné Tollu nesou název vzhledem ke svojí biochemické stavbě. Extracelulární domény obsahují různé počty motivů s opakováním bohatých na leucin (leucine-rich repeat, LRR) a cytoplasmatickou signální doménou homologní k interleukin 1 receptor (IL-1R), zvaný Toll-1R (Bowie & O’Neill, 2000).



Obrázek 2 – strukturální schéma genu TLR4 (<https://www.creative-diagnostics.com/Toll-like-Receptor-Signaling-Pathway.html>)

Tyto domény jsou zodpovědné za rozpoznávání patogenů a skládají se z 16-28 různých modulů. TLR receptory jsou exprimovány v různých imunitních, ale i neimunitních buňkách zahrnující makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty, část T lymfocytů, fibroblasty a epiteliální buňky (Akira et al. 2006).

Microbial Components	Species	TLR Usage
<b>Bacteria</b>		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
<b>Fungus</b>		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
<b>Parasites</b>		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>Viruses</b>		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
<b>Host</b>		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

ND = not determined. See text for references.

Obrázek 3 – Spektrum rozpoznávání PAMPs pomocí TLR receptorů (Akira et al. 2006)

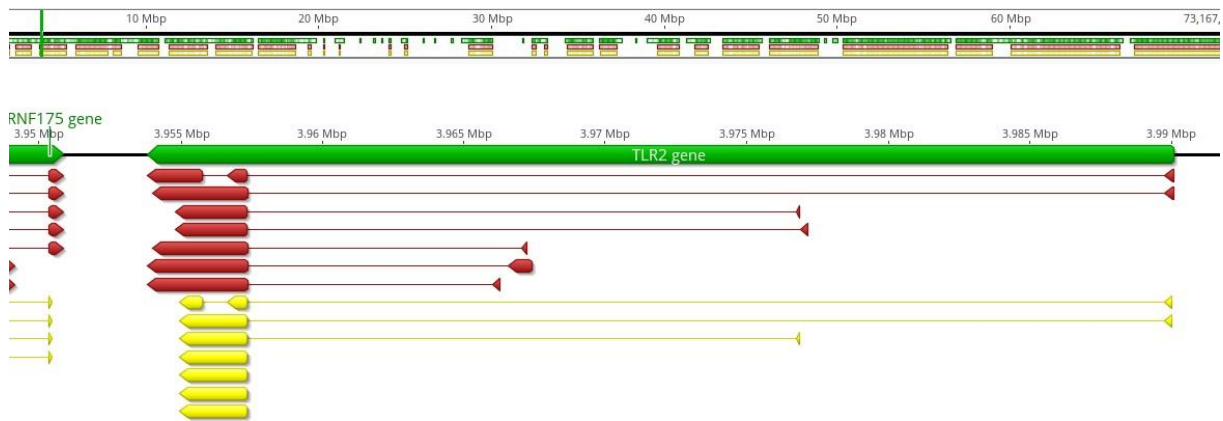
Expres TLR není statická, ale spíše je rychle modulována v reakci na útočící patogeny, různé cytokiny a enviromentální stresy. Zatímco *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* a *TLR6* jsou exprimovány na buněčném povrchu, *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* a *TLR9* jsou výhradě exprimovány v intracelulárních komponentech (Davies et al. 2008; Akira et al. 2006). V genomu skotu se nachází 10 TLR genů, které jsou kódovány na 7 chromozomech (Sharma et al. 2006; Novák 2014).

Toll-like receptory dokáží rozeznat velké množství odlišných ligandů a na základě toho je můžeme dělit do dalších podskupin. Podskupina TLR1, TLR2 a TLR6 detekuje lipidy, zatímco podskupina TLR7, TLR8, TLR9 rozpoznává nukleové kyseliny. Receptor TLR2 dokáže rozeznat velké množství PAMPs skrze všechny patogenní původce. U bakteriálních patogenů rozpoznává lipopeptidy, u kvasinek polysacharid zymosan a také další molekulární vzory virů a prvoků. Stejně široké spektrum má i receptor TLR4, který u bakterií rozpoznává lipopolysacharidy, proteiny virů a další molekulární vzory hub a prvoků (Akira et al. 2006, Seabury et al. 2007).

Studie Yang et al. (2008) a Botos et al. (2011) uvádí asociace s rezistencí na mastitidu u skotu ve spojení s geny TLR2, TLR4 TLR6 a TLR9. Receptory TLR2 a TLR4 rozpoznávají bakteriální PAMPs a jsou důležité při imunitní reakci na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Podobně studie Yang et al. 2008 popisuje funkci TLR2 přenášet signály z bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, které patří mezi hlavní původce mastitidy u skotu. Exprese genů *TLR2* a *TLR4* je vysoce zvýšena během zánětu mléčné žlázy způsobené bakteriemi *Streptococcus uberis* a *Staphylococcus aureus* (Goldammer et al. 2004). Podle studie Davies et al. (2008) lze jednoznačně konstatovat, že exprese TLR receptorů v epiteliálních buňkách je velmi důležitá při obraně endometria proti bakteriím.

### **2.3.1 Toll-like receptor 2**

Gen *TLR2* se nachází na 17 chromosomu na pozici 3990089 -> 3953807 dle referenční sekvence genomu skotu ARS-UCD1.2). Gen obsahuje 2 exony a jeho celková délka je 36 283 bp.



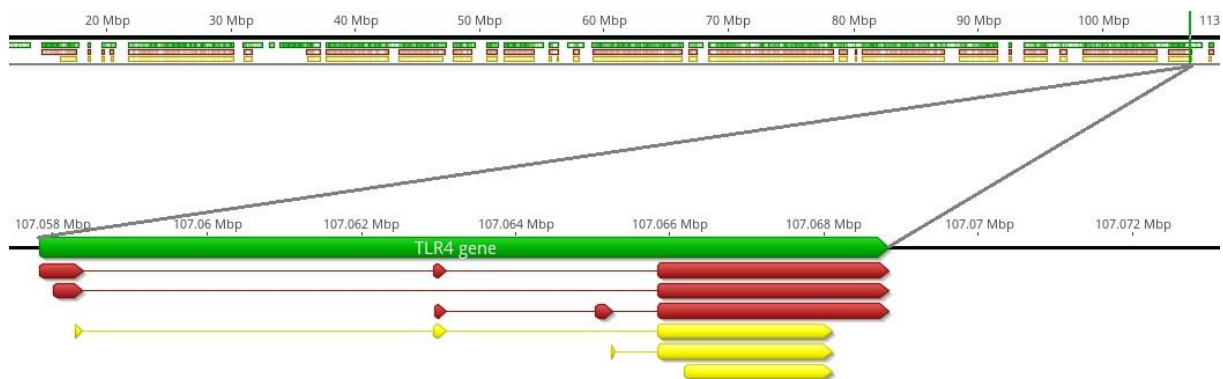
Obrázek 4 – Schéma genu *TLR4* – Výstup z programu Geneious Prime (Ref. Sekvence ARS-UCD1.2)

Protein kódovaný tímto genem je proteinem buněčného povrchu, který může tvořit heterodimery s jinými molekulami imunitního systému. Hraje zásadní roli při rozpoznávání patogenů a aktivaci přirozené imunity. Aktivace vede k up-regulaci signálních drah a modulaci zánětlivé odpovědi hostitele. Tento gen se podílí také na patogenezi několika autoimunitních onemocnění (Kang et al. 2009, GeneCards 2022).

Exprese tohoto genu byla detekována v imunitních, endotelových a také v epiteliálních buňkách (Flo et al. 2001, Brzezinska-Blaszczyk a Wierzbicki 2010). Ligandově specifické rozpoznávání a signalizace pomocí TLR2 nastává prostřednictvím heterodimerizace s TLR1 nebo TLR6. Předpokládá se, že heterodimery TLR2/TLR1 a TLR2/TLR6 jsou předem vytvořeny na buněčném povrchu (Kang et al. 2009). Tyto receptory funkčně asociují. TLR2 rozpoznává širokou řadu mikrobiálních produktů prostřednictvím spolupráce s několika proteiny, které jsou buď strukturně příbuzné, ale i odlišné (Takeda a Akira 2005). Heterodimer TLR6/2 rozpoznává mykoplazmatické peptidoglykany a lipoproteiny (Takeuchi et al. 2001). Heterodimer TLR1/2 dokáže detekovat bakteriální a mykobakteriální lipoproteiny a také lipoproteiny meningokoků (Takeuchi et al. 2002, Wyllie et al. 2000). Heterodimer TLR1/2 je kandidátní pro resistenci k paratuberkulóze a polymorfismus v kódujících úsecích těchto genů snižuje odpověď krav na infekci *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis* (MAP).

### 2.3.2 Toll-like receptor 4

Gen *TLR4* je lokalizován na 8 chromosomu na pozici 107057826–107068842 (referenční sekvence bovinního genomu ARS-UCD1.2). Gen obsahuje 3 exony s délkou 2987 bp. Celková délka genu je 11017 bp.



Obrázek 5 – Schéma genu *TLR4* – Výstup z programu Geneious Prime (Ref. Sekvence ARS-UCD1.2)

Molekula kódována tímto genem, je stejně jako u genu *TLR2*, proteinem buněčného povrchu. Receptor se skládá z extracelulární domény LRR, transmembránové domény a intracelulární domény TIR. Tento receptor rozpoznává molekuly (patogeny asociované molekulární vzory), které jsou exprimovány v infekčních organismech. Signální dráha je nejintenzivnější, pravděpodobně díky své schopnosti rekrutovat všechny čtyři známé adaptorové molekuly obsahující TIR. Signalizace *TLR4* může být iniciována nejen připojením PAMP (LPS bakterií), ale také připojením endogenních ligandů produkovaných během poškození tkáně a zánětu (fibronektin, proteiny tepelného šoku) (Hoshino et al. 1999, Roelofs et al. 2006).

Po aktivaci receptoru dochází k zprostředkování produkce cytokinů nezbytných pro rozvoj účinné imunity (Akira et al. 2006, GeneCards 2022). Gen *TLR4* spouští TRIF a MyD88-dependentní signální dráhy, na jejichž konci dochází k syntéze prozánětlivých cytokinů, interferonů a chemokinů (Bhaladhare et al. 2016). Sharma et al. (2006) uvádí gen *TLR4* jako kandidátní v úloze zvýšení obranyschopnosti vůči zánětu mléčné žlázy u skotu. Fu et al. (2013) zmiňuje zvýšenou expresi genu *TLR4* v při zánětu dělohy u skotu.



### 2.3.3 Variabilita v genech TLR receptorů

Variabilita genů toll-like receptorů byla popsána ve studii Bilgen et al. (2016), kdy byla studována, pomocí sekvenování nové generace, genetická variabilita v genech receptorů TLR2, TLR4 a TLR6 různých plemen krav Tureckého původu (původních plemen z Anatólie: Anatolian Black – AB, East Anatolian Red – EAR, South Anatolian Red (EAR), South Anatolian Red (SAR), Turkish grey (TH) a Holštýnské plemeno). Sekvenování odhalilo u 10 krav Holštýnského skotu pro gen *TLR2* 45 variant, pro gen *TLR6* 155 variant a pro gen *TLR4* 74 variant. U původních Anatólských plemen bylo hlášeno méně klinických příznaků bakteriálních infekcí jako je tuberkulóza a mastitida oproti holštýnskému skotu. Předpokládá se, že tento fakt je způsoben méně přísným genetickým výběrem v kontrastu se silnou selekcí holštýnského skotu. Nejvíce variancí bylo pozorováno u plemena SAR.

Ve studii Novák et al. (2019) bylo sekvenováno 150 býků z produkční populace Českého strakatého skotu, 35 zvířat Českého strakatého skotu z konzervované populace programu genových zdrojů ČŘ a 80 zvířat plemene Česká červinka z konzervované populace programu genových zdrojů ČR pomocí technologie PacBio. Studie prokázala značnou variabilitu v současné české simentálské populaci, kdy pro gen *TLR2* bylo nalezeno pro všechny populace 34 variant, pro gen *TLR4* bylo nalezeno 23 variant, gen *TLR6* obsahoval 23 variant, gen *TLR1* se nacházelo 27 variant a u genu *TLR5* bylo přítomno 25 variant. Produkční populace býků vykazovala nejvyšší variabilitu s nalezenými 108 variantami za všechny geny z celkových 125.

Ve studii Cargill EJ & Womack (2007) byly sekvenovány bovinní geny *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* a *TLR9* u 9 plemen *Bos taurus* a *Bos Indicus* (Aberdeen Angus, Braford, Charolais, Holstein, Limousine, Nelore, Piemontese, Romangnola). Celkem bylo sekvenováno 21 715 bp zahrnující sekvence genů TLR, které hrají hlavní roli při obraně proti virové infekci organismu. Byla odhalena přítomnost 130 jednonukleotidových polymorfismů a 9 delecí. Nejvíce polymorfismů – 96 bylo detekováno v genu *TLR3*, který má z antivirálních TLR nejdelší sekvenci.

Totožná studie byla provedena u stejných plemen pro geny *TLR1*, *TLR5* a *TLR10*. Bylo sekvenováno 11 307 bp odpovídající sekvencím vybraných genů a analýzy identifikovaly 92 jednonukleotidových variant a 6 indelových polymorfismů, přičemž 14 nesynonymních mutací

se považuje za funkčně významné. Dvě nesynonymní mutace v této studii vedly k predikci nové LRR domény. Tato skutečnost otevírá možnosti pro asociační analýzy, které mohou umožnit objasnění molekulárních mechanismů řídící rezistenci a náchylnost k mikrobiálním onemocněním postihující skot (Seabury et al. 2007).

#### 2.3.4 Polymorfismu genů Toll-like receptorů ve vztahu k funkčním znakům

Gao et al. (2018) označuje ve své práci gen *MYD88* za kandidátní pro rezistenci k paratuberkulóze skotu na základě celogenomového mapování lokusů kvantitativních znaků. Studie Bhavanirama et al. (2019) odhaluje škodlivé nesynonymní mutace (T563H, T605M) v *TLR2*, které mohou ovlivnit strukturu a funkci TLR2. Shimizu et al. (2017), na základě své studie, uvádí, že polymorfismy *TLR4* mohou být použity jako nástroj pro posouzení reprodukčního potenciálu a imunitní aktivity jednotlivých krav.

Záměna báze 513C>T v 5' UTR oblasti genu *TLR2*, stejně jako záměna báze 9787C>T v genu *TLR4*, zvyšuje citlivost k paratuberkulóze (PTB). Polymorfismy R262 a F643L v *TLR5* jsou považovány za kandidátní pro rezistenci proti paratuberkulóze způsobenou bakterií *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) (Fisher et al. 2011).

Podobně polymorfismus C2021T v genu *TLR4* vykazuje významnou asociaci s citlivostí na infekci *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Jednonukleotidová mutace může vést k změně struktury, funkce a stability proteinu a následně vést ke změně fenotypového účinku. V práci Sharma et al. (2006) bylo genotypováno 388 býků holštýnského skotu a byly nalezeny 3 SNP v *TLR4*. Tyto haplotypy polymorfismů rs8193946, rs8193060, rs29017188 byly spojeny se změnami plemenných hodnot pro perzistenci laktace a skóre somatických buněk v čerstvém kravském mléce.

Predikce SNP může sloužit jako užitečný genetický marker a být použita ke studiu účinku SNP na strukturu a funkci proteinu. Jednonukleotidové mutace G349C a C355A v genu jsou spojeny s citlivostí na onemocnění *Dermatitis digitalis* (El-Shafaey et al. 2017).

U alely C polymorfismu rs8193069 byla prokázána asociace s rezistencí na zánět mléčné žlázy a dojivosti v populaci holštýnského skotu (Zhou et al. 2017). Práce Prakash et al.

(2014) uvádí 2 varianty v genu *TLR4*, které jsou asociovány s vyšší odolností na onemocnění brucelózou.

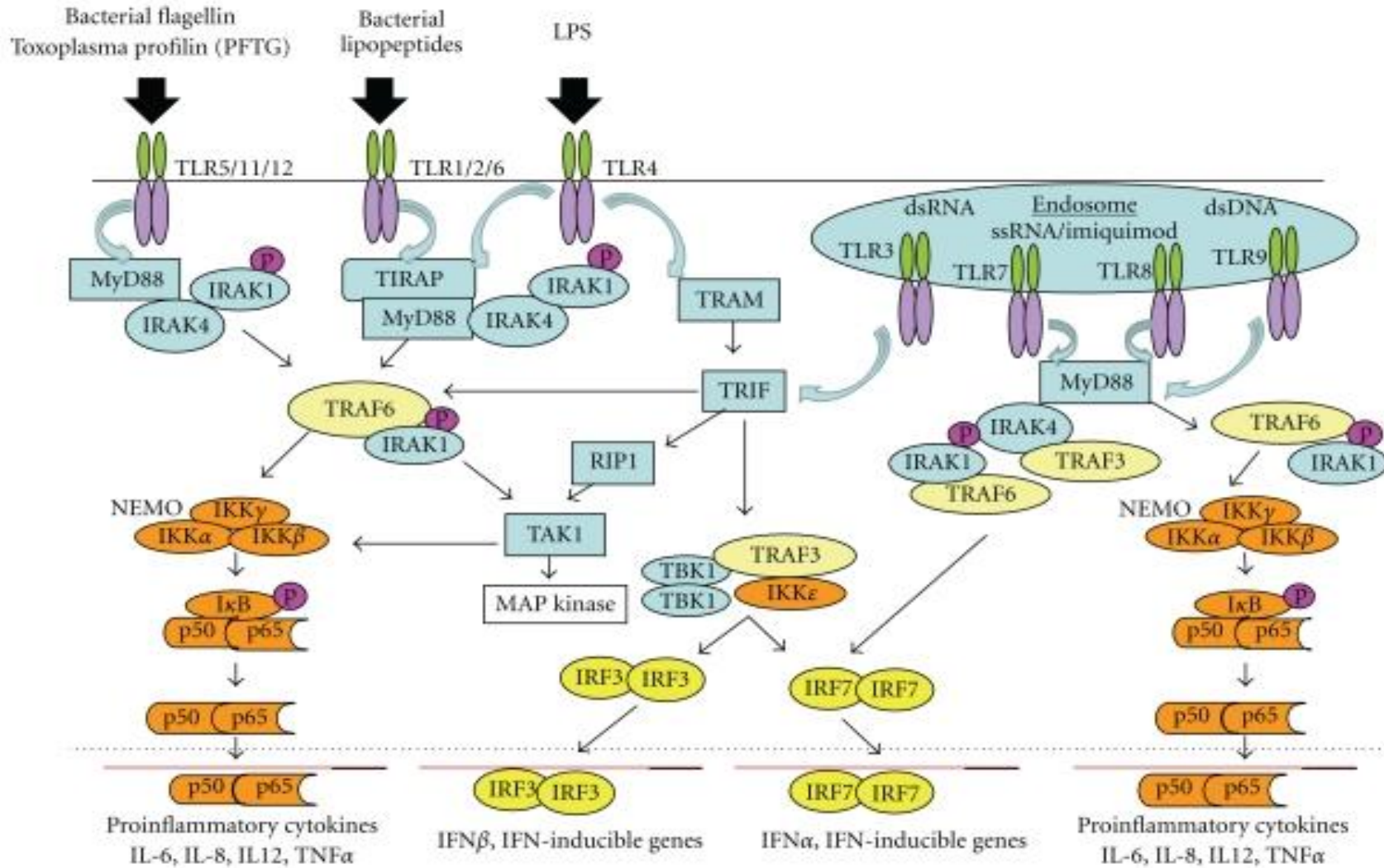
## 2.5 Signální dráhy Toll-like receptorů

Toll-like receptory aktivují několik typů signálních drah, přičemž závisí na kombinaci čtyř adaptorových molekul obsahující TIR doménu – toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP), toll-like receptor domain containing adaptor inducing interferon B (TRIF/TICAM1), TRIF related adaptor molecule 2 (TRAM/TICAM) a myeloid differentiation primary response 88 (Myd88). (Horng et al. 2001, Yamamoto et al. 2003, Akira et al. 2006). Interakce mezi adaptorovými molekulami a molekulami receptorů je klíčové pro iniciaci funkce signální dráhy. Jakmile receptor naváže ligand dochází k dimerizaci a konformačním změnám a zapojení TIR domény receptoru (Horng et al. 2001; Akira et al. 2006).

Po rozpoznání PAMP aktivují TLR intracelulární signální dráhy, které vedou k indukci genů pro zánětlivé cytokiny, jako jsou faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin 12 (IL-12). Singalizace z TLR také vyvolává upregulaci kostimulačních molekul na dendritických buňkách. Jedná se o krok, které je kritický pro indukci patogen-specifických adaptivních imunitních reakcí. Kromě toho je několik TLR schopno indukovat IFN typu I k vyvolání antivirových odpovědí (Kawai & Akira 2007).

Význam molekuly MyD88 v oblasti imunity savců je demonstrován ve studii Capparelli et al (2013), kde byla popsána statisticky významná asociace genotypu AC u jednonukleotidové mutace A625C v genu *MyD88* a 5x sníženého rizika plicní tuberkulózy. Důležitost molekuly IRAK4 je nutné demonstrovat u studií u jiných druhů savců, jelikož v současné době je nedostatek poznatků o bovinní molekule IRAK4.

Medvedev et al. (2003) uvádí IRAK4 jako klíčový pro vývoj normální zánětlivé reakce způsobené bakteriálními a nebakteriálními patogeny. Zkrácení proteinového řetězce u lidského IRAK4 v leukocytech vede k imunodeficienci (Davidson et al. 2006). Důležitou roli při imunitních reakcích organismu plní článek IRAK4 v obraně proti bakteriím *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* (Hultgren et al. 2002).

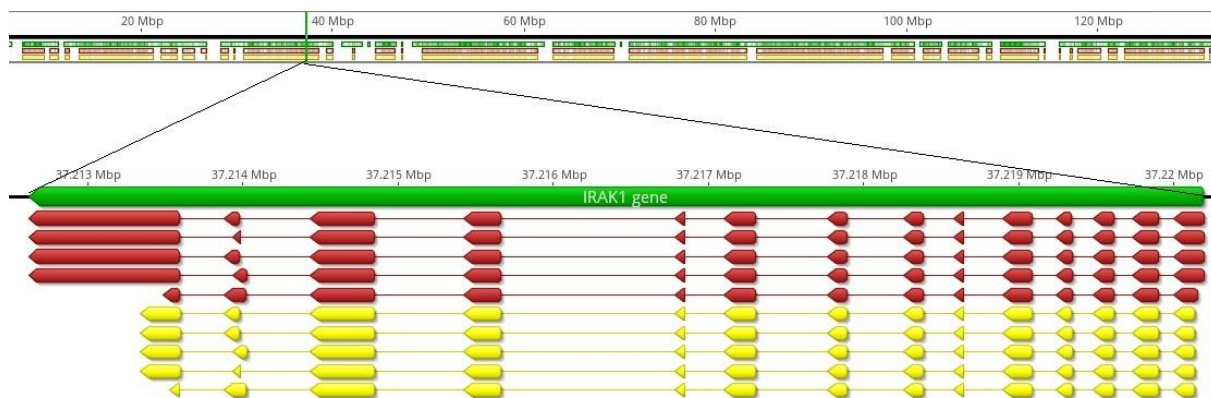


Obrázek 6 – Signální dráha TLR receptorů (Zhu & Mohan 2010)

Po fosforylaci molekul IRAK dochází k disociaci od MyD88 a interakci s TRAF6. Tvoří se komplex Ubc13 a Uev1A k podpoře syntézy lysinových 63-vázaných polyubikvitinových řetězců, které aktivují TAK1 a MAPKKK (Viz Obrázek 7) (Chen 2005). U podrodiny TLR1, TLR2, TLR4 a TLR6 dochází ke spojení MyD88 s molekulou TIRAP, což vede k stimulaci IRAK4. IRAK4 se fosforyluje a aktivuje molekulu článek IRAK1. Obě molekuly IRAK následně interagují s TRAF6 (viz Obrázek 7). Na konci signálních drah dochází k aktivaci transkripčních faktorů jaderný faktor kB (NF-κB) a aktivátorový protein 1 (AP1). Ty následně spouští syntézu typicky prozánětlivých cytokinů Interleukin 6 (IL-6) interleukin 8 (IL-8) a interleukin 12 (IL-12) (Kawai & Akira 2007).

### 2.5.1 IRAK 1

Gen pro molekulu Interleukin-1-receptor asociovaná kináza 1 (IRAK1) se nachází na chromosomu X na pozici 37 220 194 – 37 212 624. Gen má délku 7571 bp a obsahuje 14 exonů. IRAK1 je serin/treonin-proteinová kináza, která hraje důležitou roli v iniciaci vrozené imunitní reakce proti patogenům.



Obrázek 7 – Schéma genu *IRAK1* – Výstup z programu Geneious Prime (Ref. Sekvence ARS-UCD1.2)

IRAK1 je společně s molekulou Myd88 součástí receptor-signálního komplexu po navázání antigenu na receptor. Tento komplex je fosforylován molekulou IRAK4 a poté dochází autofosforylaci a aktivaci kinázy (Uniprot 2007). Interleukin-1-receptor asociovaná kináza 4

(IRAK4) je serin/treonin proteinová kináza, která hraje, stejně jako molekula IRAK1, klíčovou úlohu v iniciaci vrozené imunitní reakce. Následně dochází k fosforylaci E3 ubikvitinových ligáz Pellino proteiny (PELI1,PELI2,PELI3) k podpoře Pellino-zprostředkované polyubikvitinace IRAK1. Poté se doména vázající ubikvitin IKBKG/NEMO naváže na polyubikvitinovaný IRAK1, čímž se spojí komplex IRAK1-MAP3K7/TAK1-TRAF6 a komplex NEMO-IKKA-IKKB. MAP3K7/TAK1 aktivuje IKK (CHUK/IKKA a IKBKB/IKKB), který umožní jadernou translokaci a aktivaci NF-kB (Genecards 2022).

Alternativně může proběhnout fosforylace článku dráhy TIRAP, aby se podpořila jeho ubikvitinace a následná degradace. Následně je fosforylován interferonový regulační faktor 7 (IRF7), který způsobuje translokaci do jádra. Translokace umožňuje transkripční aktivaci genů IFN typu I, které pohánějí buňku do antivirového stavu (Genecards 2022).

V případě bovinního IRAK1, studie Eberlein et al. (2011) informuje významu tohoto genu i mimo imunitní odpověď organismu. Důležitosti genu *IRAK1* byla prokázána u mnoha tkání (játra, mléčná žláza, játra, podkožní tuk), které souvisí, nebo jsou zapojeny do energetického metabolismu a metabolismu tuků. Odlišná exprese genu *IRAK1* byla také nalezena u zvířat s různým obsahem intramuskulárního tuku.

Dle studie Hosseini et al. (2020) polymorfismus v lidském genu *IRAK1* může také vést k autoimunitním onemocněním jako například revmatoidní artritida. Tento fakt je potvrzen studií Zhang et al. (2012), která uvádí asociaci polymorfismu rs3027898 C/A v lidském genu *IRAK1* se zvýšeným rizikem tohoto autoimunitního onemocnění. Studie Kucinkas et al. (2020) a Zhao et al. (2020) spojují polymorfismy rs1059703 a rs3027898 s vyšším rizikem rozvoje autoimunitních onemocnění revmatoidní artritidy a lupénky. Studie Sperry et al. (2014) uvádí polymorfismus genu *IRAK1* rs1059703 u lidí jako prediktor mnohočetného orgánového selhání a mortality po poranění a demonstruje důležitost signálních drah receptoru TLR po poranění. Polymorfismy v genech *IRAK1* rs1059701 a rs1059702 jsou asociovány s výskytem závažného invazivního pneumokokového onemocnění (SIPD). Tyto polymorfismy souvisí s vyšším rizikem rozvoje SIPD (Carrasco-Colom et al. 2015).

## **2.6 Plemeno Český strakatý skot**

### **2.6.1 Charakteristika plemene**

Plemeno Český strakatý skot patří do celosvětové populace strakatých plemen, které mají stejný fylogenetický původ a jsou rozšířené na všech kontinentech. Jedná se o původní plemeno skotu na území České republiky. Plemeno má červenostrakaté zbarvení srsti a vyznačuje se středním až větším tělesným rámcem s dobrým osvalením. Je známo pro dobrý zdravotní stav, pravidelnou plodnost, snadné porody, vitalitu telat, bezproblémový odchov a vykazuje dobré pastevní schopnosti (ČESTR 2022). K roku 2020 bylo v České republice registrováno 112 375 samců, 149 307 jalovic a 157 743 krav českého strakatého skotu (Bucek et al. 2020).

### **2.6.2 Historie plemene**

Vznik plemene Český strakatý skot, dříve označováno jako červenostrakatý skot, je datován ve 30. letech 20. století. Jednalo se o snahu sloučit všechny rázy strakatého skotu chovaného v Čechách a na Moravě do jedné populace. Po druhé světové válce se začalo zušlechťovat pro zlepšení mléčné užitkovosti a tvaru vemene Švédským černobílým skotem, Ayrshiským skotem a Dánským červeným skotem. Dochází k přestavbě trojstranné užitkovosti mléko – maso – tah na dvoustrannou užitkovost mléko - maso (Skládanka et al. 2014; Svaz chovatelů Českého strakatého skotu 2012).

V období 60. let se využívalo ke zušlechťovacímu křížení, vedle čistokrevné plemenitby, převážně Ayrshirské plemeno, které bylo určené ke zlepšení produkce mléka, funkčních a tvarových vlastností vemene, utváření končetin a pastevních schopností. Toto křížení však zmenšilo tělesný rámec a negativně ovlivnilo masnou užitkovost. Současný název Český strakatý skot získává plemeno až v roce 1967 (Skládanka et al. 2014, CESTR 2022).

Od 70. let se začali k zušlechťovacímu křížení používat býci červeného holštýnského skotu (označovaného jako RED). Docházelo ke zvětšení tělesného rámce, zvýšení mléčné užitkovosti a utváření vemene, ale také ke poklesu jatečné hodnoty a zhoršení utváření končetin (Skládanka et al. 2014, CESTR 2022). V roce 1990 byl založen Svaz chovatelů českého strakatého skotu, který realizuje šlechtitelský program a vedení plemenné knihy.

### 2.6.3 Chovný cíl a standard plemene

Dle aktuálních informací o základních parametrech chovného cíle na serveru svazu chovatelů českého strakatého skotu (CESTR 2022) by se měla doживost u prvotetek pohybovat mezi 6500–7500 kg mléka a u dospělých krav mezi 7500 – 8500 kg mléka. Produkční využití dojníc by mělo zahrnovat 4-5 laktací. Obsah bílkovin v mléce by měl být nejméně 3,6 %, obsah tuku by se měl pohybovat mezi 4-4,1 % a poměr obsahu bílkovin a tuku v mléce je stanoven na 1: 1,15 – 1,2.

Plemeno	Počet laktací	Dnů	Mléko (kg)	Obsah tuku (%)	Prod. tuku (kg)	Obsah bílkovin (%)	Prod. bílkovin (kg)	Mez. (dny)
České strakaté C51 % a více	99 901	294	7 767	4,04	313	3,58	278	392
Holštýnské HR 51 % a více	171 425	298	10 254	3,90	400	3,41	349	400
Montbéliarde	3 102	297	8 168	4,08	333	3,57	292	388
Ayrshire	24	285	8 854	4,12	365	3,39	300	425
Jersey	1 017	296	7 509	4,75	357	3,91	293	400
Braunvieh	1 507	296	8 771	4,10	359	3,60	316	416
Normandské 75 % a více	138	297	6 695	4,05	271	3,55	238	413
Ostatní plemena a kříženko	15 703	295	8 224	4,00	329	3,50	288	399

**Pramen: ČMSCH, a. s.**

Obrázek 8 – Výsledky kontroly užítkovosti podle plemen v roce 2020 v ČR (Bucek et al. 2020)

Základní parametry chovného cíle jsou pro masnou užítkovost – denní přírůstek ve výkrmu býků 1300 g a více s jatečnou výtěžností žirných býků 57–59 %. Reprodukční parametry chovného cíle uvádí svaz chovatelů pro věk při prvním zapuštění 16–18 měsíců a věk při prvním otelení 26–28 měsíců. Servis perioda by se měla pohybovat do 100 dní. Inseminační index je uváděn do 1,8. Březost po první inseminaci by u jalovic měla být 60–70 %, u krav 50–60 %. Mezidobí by se mělo pohybovat mezi 380–390 dny.

Hmotnost jalovic ve věku 12 měsíců je dle standardu plemene 340–360 kg. Hmotnost jalovic při 1. zapuštění je 420-450 kg. Hmotnost krav v dospělosti by se měla pohybovat mezi 650–750 kg s výškou v kříži mezi 140–144 cm. U býků by hmotnost v dospělosti měla dosahovat 1200–1300 kg s výškou v kříži mezi 152–160 cm (CESTR 2022).



## **2.7 Molekulárně genetické metody**

Molekulárně genetické metody způsobily revoluci v oblasti genetiky a umožnily výzkumníkům odhalit složitost genetického kódu a pochopit mechanismy, které jsou základem dědičných vlastností a nemocí. Tyto výkonné techniky umožnily značný posun v našich znalostech o DNA, genech a jejich funkcích a poskytly nový pohled na základní procesy života.

### **2.7.1 Polymerázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR) využívá schopnosti enzymu DNA polymerázy syntetizovat komplementární řetězce DNA sekvenčně specifickým způsobem. Reakce vyžaduje templátovou DNA, oligonukleotidy DNA – primery, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) a enzym DNA polymerázu. Proces PCR se skládá ze tří hlavních kroků:

#### **Denaturace**

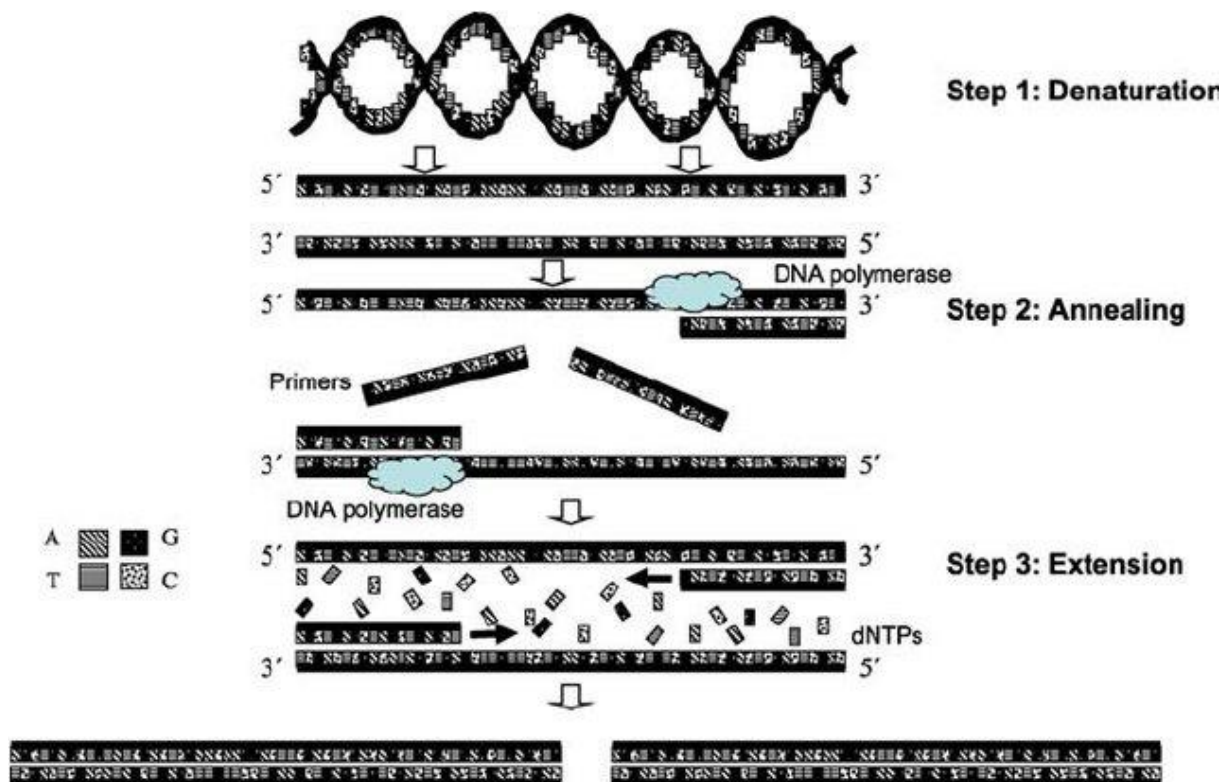
Během denaturačního kroku se DNA zahřeje na vysokou teplotu (typicky na 94-98 °C), aby se dvouřetězcová DNA oddělila na dva jednoduché řetězce. Tento proces přerušuje vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi, což má za následek denaturaci molekuly DNA.

#### **Anelace**

Po denaturaci se reakční teplota sníží typicky na 50-65 °C, aby se DNA primery mohly vázat na komplementární oblasti templátu DNA. Primery jsou navrženy tak, aby ohraničovaly požadovanou sekvenci DNA a poskytovaly výchozí produkt pro syntézu DNA v následujících krocích.

#### **Elongace**

Při optimální teplotě (obvykle 68-72 °C) prodlužuje enzym DNA polymeráza primery přidáním komplementárních nukleotidů k templátovým řetězcům DNA. DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec DNA pomocí templátového řetězce jako vodítka, což vede k amplifikaci cílové sekvence DNA (Saiki et al. 1988).



Obrázek 9 – Princip polymerázové řetězové reakce (Abed 2009)

Bylo vyvinuto několik modifikací a variací PCR, aby se zlepšily její aplikace. Například nested PCR zahrnuje 2 sady primerů, přičemž druhá sada se váže v oblasti amplifikované první sadou (Innis et al. 1990). Tato technika zvyšuje specifitu a citlivost amplifikace. Reverzní transkripční PCR (RT-PCR) umožňuje amplifikaci komplementární DNA (cDNA) generované z RNA templátů prostřednictvím reverzní transkripce (Gibson et al. 2008). RT-PCR slouží k studiím na genových expresích a zkoumání RNA virů.

PCR se využívá v širokém spektru vědních oblastí jako je genetická diagnostika, forenzní věda, evoluční biologie, environmentální studie a výzkum infekčních chorob. V genetické diagnostice umožňují metody založené na PCR detekci mutací související s onemocněním, identifikaci genetických poruch a hodnocení imunitní odpovědi na léčbu (Kwok et al. 1994; Higuchi et al. 1992). Ve forenzní vědě způsobila PCR revoluci v profilování DNA, což umožňuje analýzu nepatrných množství DNA (Gill et al. 1994). PCR také pomohla objasnit evoluční vztahy amplifikací genetických markerů napříč druhy organismů. Techniky založené na PCR umožňují detekovat a charakterizovat patogeny odpovědné za infekční onemocnění.

### 2.7.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR) také známá jako kvantitativní PCR (qPCR), je výkonná technika molekulární biologie, která umožňuje přesnou kvantifikaci nukleových kyselin. Na rozdíl od konvenční PCR, která poskytuje kvalitativní informace o amplifikaci DNA, PCR v reálném čase umožňuje vědcům sledovat proces amplifikace v reálném čase a poskytuje přesná a kvantitativní data (Gibson et al. 1996). Tato metoda způsobila revoluci v různých oblastech včetně genomiky, analýzy genové exprese, mikrobiální detekce a klinické diagnostiky (Higuchi et al. 1993).

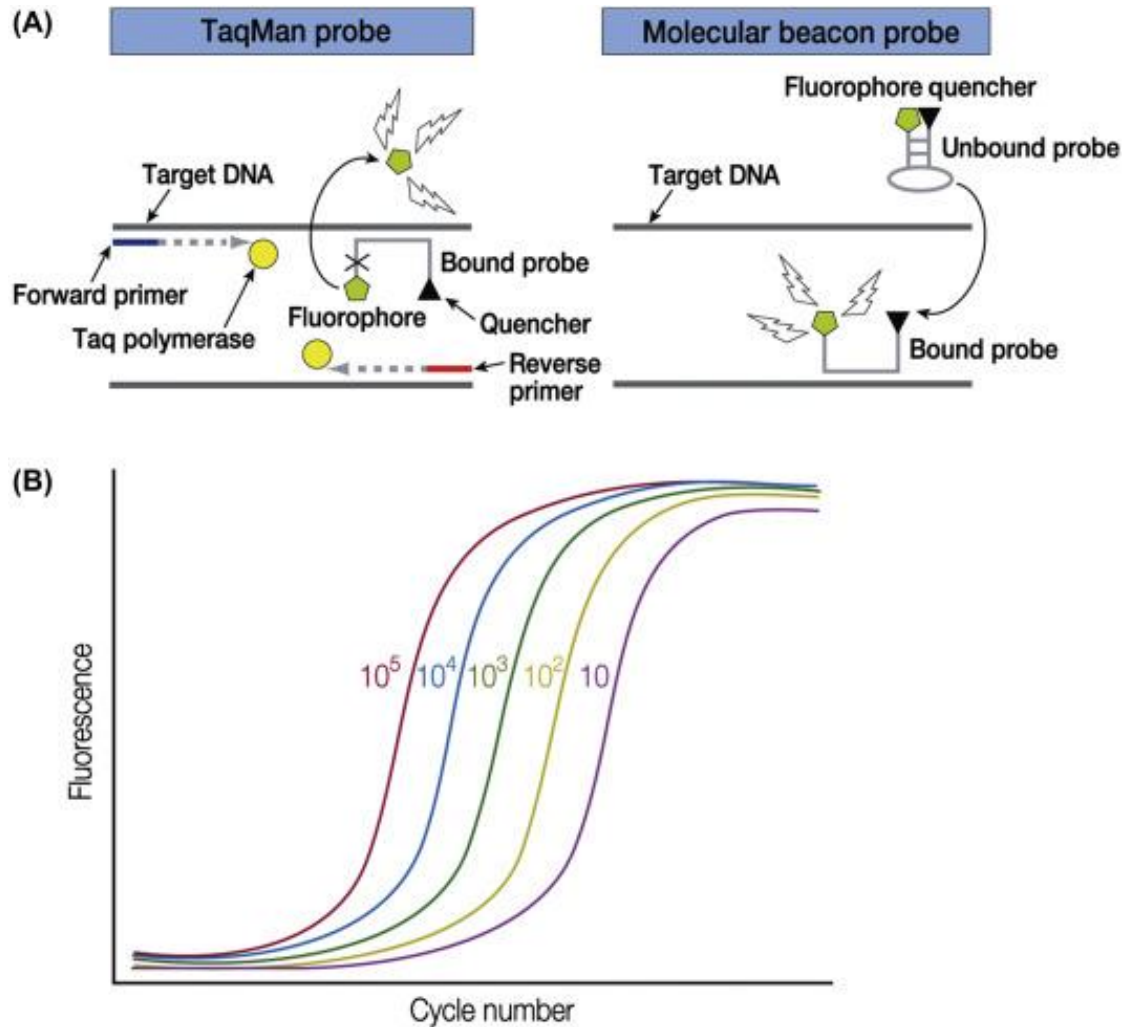
PCR v reálném čase je založena na principech tradiční PCR se začleněním technologií fluorescenční detekce. Metoda zahrnuje použití templátové DNA, specifických primerů, fluorescenčních sond nebo barviv a termostabilní DNA polymerázy. K procesu amplifikace dochází v termocykléru vybaveném detekčními schopnostmi v reálném čase (Gibson et al. 1996).

qPCR umožňuje přesnou kvantifikaci úrovní genové exprese. Měřením amplifikace specifických transkriptů mRNA je možné měřit genovou expresi, studovat mechanismy genové regulace a zkoumat změny v genové expresi související s onemocněními (Pfaffl et al. 2004). Současně se využívá pro detekci patogenů a mikrobiální analýzy. Umožňuje rychlou a citlivou identifikaci a kvantifikaci patogenů, včetně bakterií, virů a hub. Pomocí real time PCR je možné detekovat genetické mutace zahrnující jednonukleotidový polymorfismus (SNP), inserce a delece. Metoda je široce používána ve studiích genetických asociačních studií a medicíně, kde je rozhodující přesná a kvantitativní analýza (Syvanen 2001).

Metoda vyžaduje DNA templát, specifické primery, fluorescenční sondy nebo barviva a termostabilní DNA polymerázu. Proces začíná denaturačním krokem, kdy se templát DNA zahřeje, aby se oddělila vlákna DNA (Heid et al. 1996; Ririe et al. 1997). Poté následuje krok nasedání, kdy se teplota sníží, aby se primery mohly specificky vázat na cílové sekvence DNA. Následuje krok extenze, kdy DNA polymeráza syntetizuje nová vlákna DNA pomocí primerů jako templátu (Gibson et al. 1996).

Během amplifikačního procesu se fluorescence specifických sond nebo barviv zvyšuje úměrně množství amplifikované DNA (Livak et al. 1995; Tyagi et al. 1996). V závislosti na typu

použitých sond se používají různé metody detekce. Jedním běžně používaným přístupem je použití hydrolyzačních sond, jako jsou sondy TaqMan, které se skládají z fluorescenčního barviva a zhášecí molekuly (Quencher). Fluorescence barviva je snižována, když je sonda intaktní. Jak však DNA polymeráza štěpí sondu během amplifikace, barvivo a zhášecí molekula se oddělují, což vede ke zvýšení intenzity fluorescence (Livak et al. 1995; Ryu 2017).



Obrázek 10 – Princip RT-PCR (Ryu 2017) – A: Porovnání mezi sondami TaqMan a Beacon B: Diagram popisuje vztah počtu kopií DNA a cyklu amplifikace

Dalším přístupem je použití hybridizačních sond, jako jsou molekulární majáky (beacon) nebo sondy Scorpions, které procházejí konformační změnou po navázání na cílovou sekvenci DNA (Obrázek 10). Tato konformační změna odděluje fluorescenční reportérové barvivo od zhášeče, což vede ke zvýšení fluorescenčního signálu (Tyagi et al. 1996; Whitcombe et al. 1999).

Kromě toho lze použít barviva vázající se na DNA, jako je SYBR Green, která jsou v interakci dvouvláknovou DNA a emitují fluorescenci. Jak se zvyšuje množství amplifikované DNA, zvyšuje se vazba SYBR Green na amplifikované produkty, což vede ke zvýšení intenzity fluorescence (Higuchi et al. 1992).

### **2.7.3 Sangerovo sekvenování**

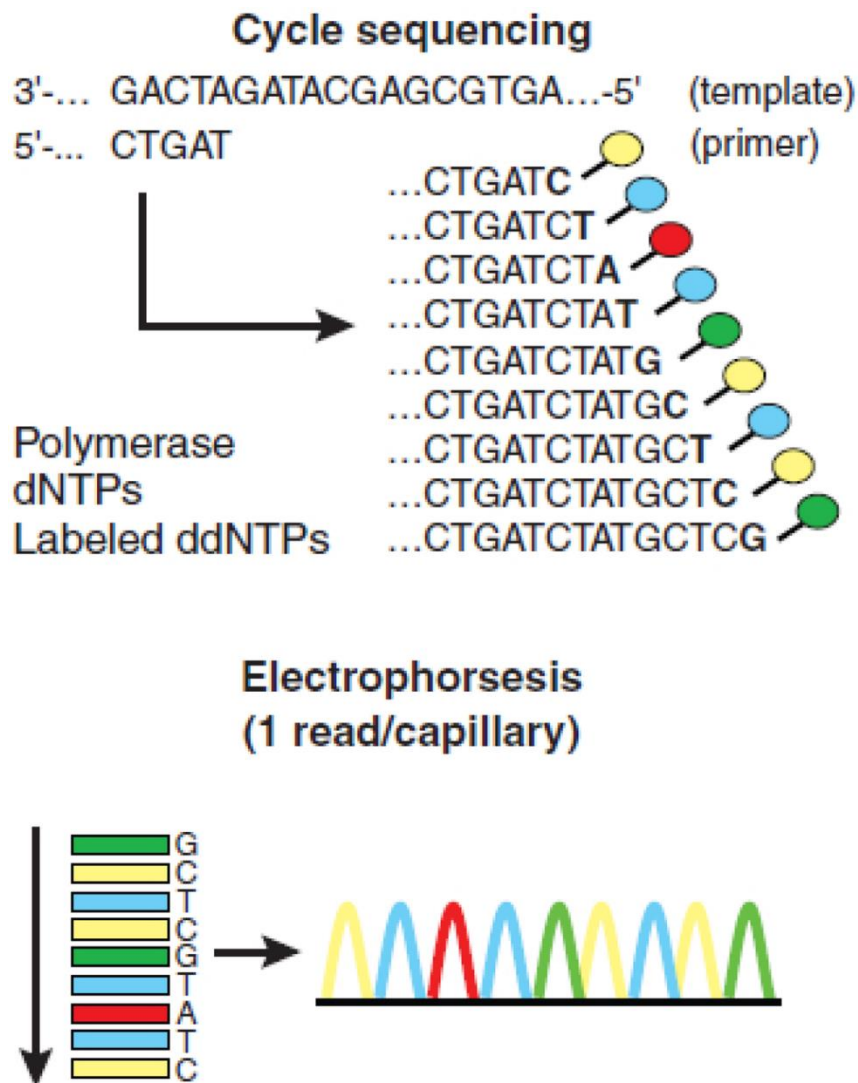
Sangerovo sekvenování, také známé jako dideoxy sekvenování nebo sekvenování zakončení řetězce, je základní metodou pro stanovení sekvence DNA daného vzorku. Tato převratná technologie vyvinutá Frederickem Sangerem na konci 70. let 20. století způsobila revoluci v oblasti genetiky a hrála zásadní roli v několika oblastech biologického výzkumu, včetně mapování genomu, genetické diagnostiky a molekulární evoluce (Jones, 2012; Verma et al. 2017).

Sangerovo sekvenování je založeno na syntéze řetězců DNA pomocí enzymu DNA polymerázy a upravené verze čtyř nukleotidových bází (dideoxynukleotidů). Metodika využívá terminaci řetězce, kde začlenění dideoxynukleotidu vede k ukončení syntézy DNA. Použitím směsi běžných nukleotidů a malých množství dideoxynukleotidů značených fluorescenčními barvivy se během sekvenační reakce vytvoří soubor fragmentů DNA s různými délkami. Tyto fragmenty jsou poté separovány na základě velikosti pomocí kapilární elektroforézy a detekovány fluorescencí, čímž se odhalí sekvence DNA (Valencia et al. 2013).

Pracovní postup Sangerova sekvenování zahrnuje několik klíčových kroků. Nejprve je vybraná oblast genu amplifikována pomocí specifických primerů v polymerázové řetězové reakci (PCR). Dále je amplikon DNA podroben sekvenační reakci, která zahrnuje DNA polymerázu, fluorescenčně značené dideoxynukleotidy a běžné nukleotidy. Jak syntéza DNA pokračuje, k ukončení rostoucího řetězce dochází náhodně, když je inkorporován dideoxynukleotid (Obrázek 11) Výsledná směs obsahuje fragmenty různých délek zakončené konkrétním značeným nukleotidem (Smith et al. 1986; Leong 2014).

K oddělení fragmentů DNA se používá kapilární elektroforéza. Vzorky se vloží do kapiláry naplněné gelovou maticí nebo roztokem polymeru a aplikuje se elektrické pole. Záporně nabitě fragmenty DNA migrují kapilárou, přičemž menší fragmenty putují rychleji než

delší. Když fragmenty procházejí detektorem, jsou fluorescenční signály emitované značenými dideoxynukleotidy zaznamenány a převedeny na digitální chromatogram představující sekvenci DNA (Ruiz-Martinez et al. 1993).



Obrázek 11 – Princip Sangerova sekvenování (Leong 2014)

Sangerovo sekvenování bylo nápomocné v mnoha oblastech výzkumu, včetně genetiky, molekulární biologie a klinické diagnostiky. Hraje klíčovou roli při sekvenování lidského genomu, umožňuje identifikaci genů spojených s onemocněním a genetických variací (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Kromě toho se Sangerovo sekvenování často používá pro validaci a ověřování konstruktů DNA v genetickém inženýrství, identifikaci mutací u dědičných poruch a charakterizaci mikrobiálních genomů. Tato technologie navíc usnadnila studium evolučních

vztahů, protože sekvence DNA získané pomocí Sangerova sekvenování umožňují výzkumníkům porovnávat genetické složení různých druhů (Johnson et al. 2010).

#### **2.7.4 Analýza křivky tání při vysokém teplotním rozlišení**

Analýza křivky tání při vysokém teplotním rozlišení (High resolution melting, HRM) je další aplikací PCR v reálném čase. Dochází ke kombinaci PCR amplifikace a analýzy křivky tání při vysokém rozlišení, kdy jsou sledovány poklesy fluorescence v závislosti na zvyšování teploty. Analýza křivky umožňuje identifikaci variant v nukleových kyselinách, jako jsou jednonukleotidové polymorfismy, inserce, delece a další strukturální variance (Wittwer et al. 2003).

V prvním kroku je amplifikován vybraný úsek DNA, který je určen pro provedení analýzy pomocí PCR primerů, které ohraničí region. PCR směs musí obsahovat fluorescenční barvivo (SYBR Green, EvaGreen), které se váže mezi vlákna DNA. PCR amplifikace je realizována v Real-time termocykléru za optimalizovaných podmínek pro realizaci reakce a výsledné fragmenty slouží jako vstupní materiál pro analýzu křivky tání (Montgomery et al. 2007).

Fragmenty následně procházejí tepelnou denaturací, kdy se teplota postupně zvyšuje a dochází tak k rozpadu vláken DNA. Během tohoto procesu je pravidelně měřena intenzita fluorescence pomocí barviva vázaného na DNA, které vysílá signál při navázání na dvouvláknovou DNA. Pokles fluorescenčního signálu s rostoucí teplotou odpovídá rozpadu řetězců DNA. Rychlost a teplota, se kterou klesá fluorescenční signál je závislá na sekvenci nukleotidů. Získaná fluorescenční data jsou analyzována za účelem vytvoření křivek tání, které charakterizují tání sledované DNA. Pro vyhodnocení lze použít různé softwarové nástroje. Obvykle software vypočítá derivaci fluorescenční křivky, která vykazuje odlišný tvar založený na rozdílech v sekvenci DNA přítomných ve vzorcích. Pokud se ve sledovaném fragmentu nachází jednonukleotidový polymorfismus, metoda je schopna rozlišit jednotlivé genotypy (Wittwer et al. 2003; Herrmann et al. 2006).

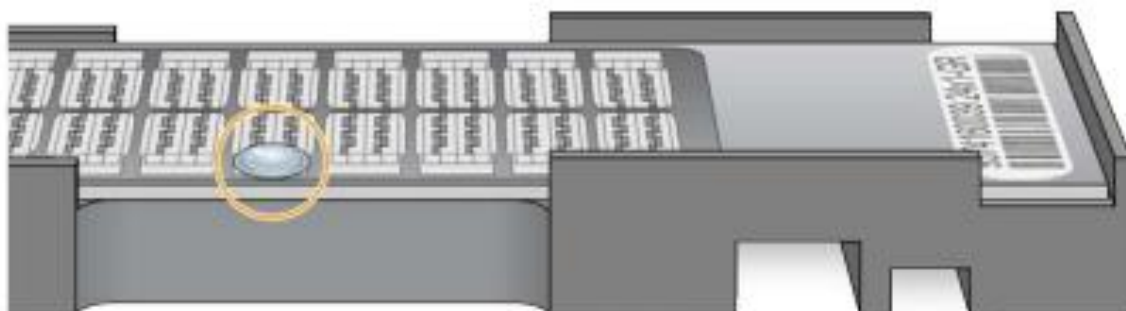
HRM má široké spektrum využití v genetickém výzkumu a klinické diagnostice. Metoda je široce používána pro genotypizační studie, jelikož přesně rozlišuje jednotlivé nukleotidové záměny. Reakce je velmi často realizována v jedné zkumavce, do které se v průběhu

nezasahuje. Limituje se tím tedy šance na kontaminaci. HRM je důležitou metodou pro screening mutací v klinické genetice, protože poskytuje nákladově a časově efektivní alternativu k tradičním metodám sekvenování (Gundry et al 2003; Milbury et al 2011).

### 2.7.5 DNA čipy

Technologie DNA čipů způsobila revoluci ve výzkumu genomiky a umožnila analýzu tisíce genů a genetických variant. Tato technologie pochází z tradičních testů na pevných fázích – DNA/RNA dot blot hybridizace a ELISA (Enzym-linked immuno sorbent assay), které se v laboratořích využívají po desetiletí. Testy na pevné fázi (solid phase assay) mají molekuly připojené k pevnému nosiči a tyto molekuly se označují jako zachycovací molekuly nebo sondy. Zachycovací molekuly testují vzorek na přítomnost cílových molekul. Sonda by měla vykazovat co nejvyšší specifitu a afinitu k cílové molekule. Sondami mohou být produkty PCR, oligonukleotidy, plazmidy, nebo umělé bakteriální chromozomy (Schena et al. 1995; Zammattéo et al. 2000).

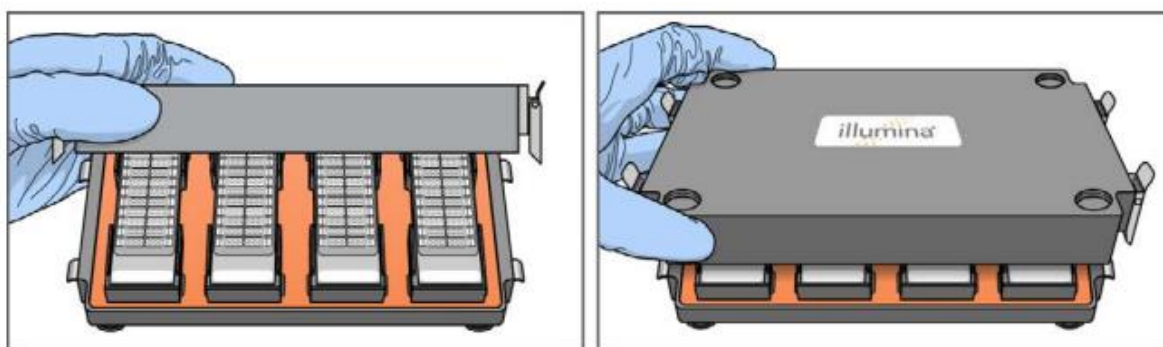
Velké množství sond je imobilizováno na pevném nosiči čipu, což poskytuje obrovskou kapacitu paralelní analýzy, potřebné k analýze celých genomů a transkriptomů v jednom analyzačním procesu. Sondy jsou imobilizovány v polích, které se skládají ze skvrn na pevném podkladu, kde každá skvrna obsahuje více kopií sondy pro konkrétní místo na chromozomu. Identifikátor sond je zakódován pozicí na čipu a je identifikována při čtení čipu. Mikročipy obsahují tisíce až miliony sond.



Obrázek 12 – Nanesení vzorku na pole DNA čipu – v případě technologie Infinum HTS Assay (Illumina, 2019) se vzorky nanášejí na kraj pole. Jedno sklo obsahuje 24 polí pro vzorky (Illumina, 2019).



Operace, při které je vzorku umožněno reagovat se sondami za účelem vytvoření interakcí sonda – cílová sekvence, se nazývá hybridizace. Vzorek a sondy se nechávají reagovat za podmínek, které usnadňují hybridizaci. Jedná se typicky o dlouhé doby hybridizace v pufrch s vysokou iontovou silou při relativně vysokých teplotách. Míchání se často využívá pro zvýšení kinetiky hybridizace, snížení ostatních vazeb a získáním homogenní hybridizace na čipu. Po hybridizaci obvykle následuje důkladné promývací postupy, aby se odstranily křížové hybridizace (navázání sond na nesprávné místo). Cílové molekuly jsou značeny pomocí fluorescenčních molekul nebo jiných barviv buď před nebo po hybridizaci a cílová hybridizace sonda – cílová sekvence lze detekovat prostřednictvím generování signálu. Signál neposkytuje žádnou jinou informaci kromě přítomnosti cílové sekvence (Dufva, 2009).

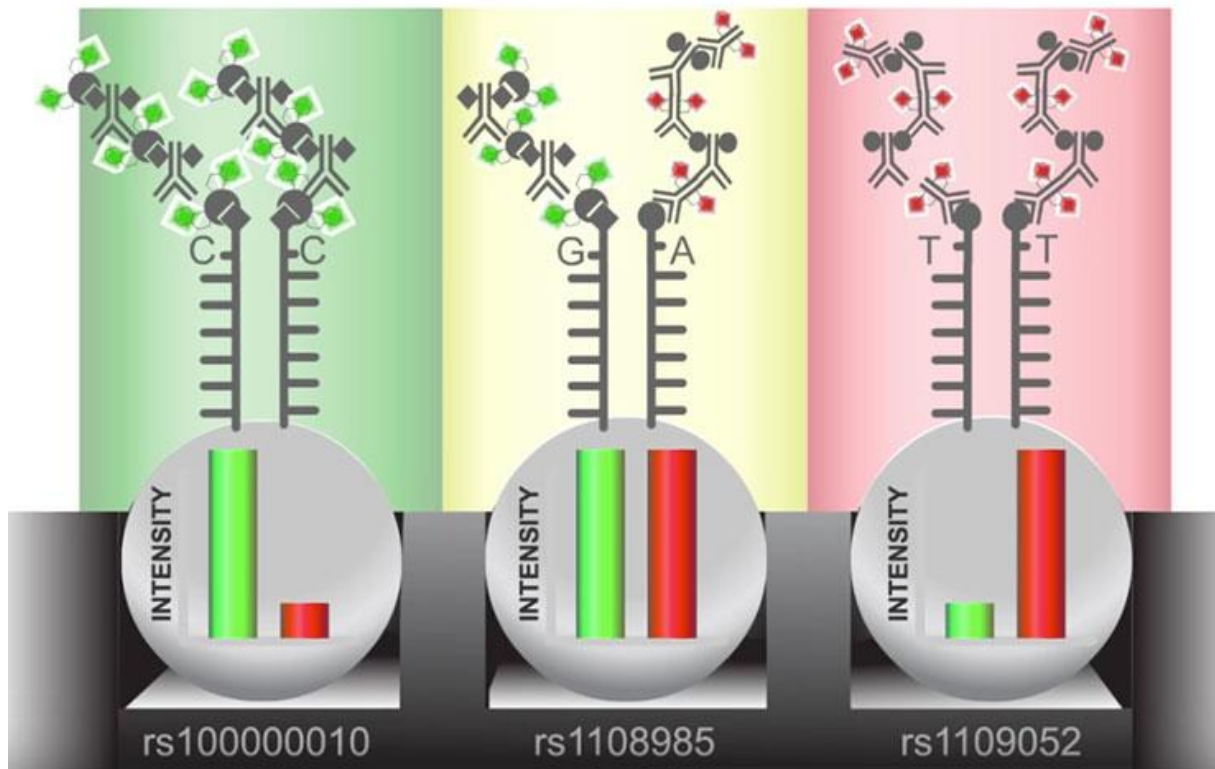


Obrázek 13 – Hybridizace DNA čipů technologie Infinum HTS Assay (Illumina, 2019) – Čipy se uzavírají do pouzder a za třepání se nechávají hybridizovat po dobu 16–24 hodin v hybridizační peci (Illumina, 2019).

Při analýze jednonukleotidových mutací (SNP) v celém genomu se využívá alelicky specifická hybridizace a alelicky specifické prodlužování primeru. Při alelicky specifické hybridizaci jsou sondy centrovány nad místem mutace tak, že variantní báze jsou přibližně uprostřed sondy. Umístění variantní báze do středu sondy destabilizuje špatně přiřazené hybridy a sonda je proto citlivá na mutace v cíli. Pro detekci konkrétního SNP se používají alespoň dvě sondy: jedna sonda se dokonale shoduje s první alelickou variantou a další sonda je specifická pro druhou alelickou variantu. Relativní síla signálu mezi dvěma různými sondami po hybridizaci a promytí se používá k stanovení genotypu. Pro analýzu každého SNP se využívá typicky více sond, aby byla dosažena dostatečná specifičnost testu (Dufva 2009; Illumina 2019)

Alelicky specifické prodloužení primeru je založeno na umístění sond tak, že poslední nukleotid je umístěn nad místem SNP. Když DNA prochází přes čip, každá sonda se váže na

komplementární sekvenci ve vzorku DNA. Alelová specifita je dána prodloužením o jednu bázi, která zahnuje jeden ze čtyř značených nukleotidů. Pochází poté k excitaci laserem a nukleotidová barva emituje signál. Intenzita signálu pak předává informaci o alelickém poměru v tomto lokusu (Obrázek 14) (Illumina 2019).



Obrázek 14 – Princip Alelicky specifického primeru – na základě emitovaného signálu jsou získány informace o příslušném genotypu (Illumina, 2019)

## 2.8 Molekulární genetiky ve šlechtění zvířat

Umělá selekce byla u domestikovaných druhů po staletí založena na vlastních fenotypoch zvířat. V průběhu 20. století se nejprve využívaly selekční indexy, které nahradila metoda BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) – Nejlepší lineární nevychýlená předpověď, která využívá sofistikovanější přístup spoléhající na smíšené lineární modely. Umožňuje použití informací o fenotypoch příbuzných zvířat k predikci plemenných hodnot kandidátů na selekci. To vedlo k úspěšnému výběru snadno zaznamenaných fenotypových znaků se střední nebo vysokou dědivostí. Aby však byly účinné pro vlastnosti, které je obtížné měřit nebo s nízkou dědivostí, vyžadovalo to nákladné investice do fenotypizace (Boichard et al. 2016).

### 2.8.1 QTL a MAS

Vznik genomiky jako disciplíny v 80 letech 20 století vedlo k identifikování genů a genetických variant, které ovlivňují velké množství lokusů kvantitativních znaků QTL (Quantitative Trait Loci). Globální hledání QTL začalo u všech druhů hospodářských zvířat, což připravilo cestu pro selekci pomocí markerů (MAS). Přístup MAS byl úspěšný hlavně u znaků s jednoduchým genetickým determinismem, ale v mnoha složitějších situacích poskytl neuspokojivé výsledky, hlavně kvůli přecenění části genetické variability vysvětlené těmito malými počty QTL a také nízkou asociací (nebo vazebnou nerovnováhou) mezi markery a QTL na úrovni populace. Kvantitativní lokusy byly zpočátku mapovány pomocí vazebných analýz a poté celogenomovými asociačními studii (Boichard et al. 2016; Georges et al. 2019).

### 2.8.2 Genomická selekce

Přelomovým přístupem k selekci s využitím molekulárních dat se stala studie Meuwissen et al. (2001), kdy se plemenná hodnota odhaduje z markerů, které pokrývají celý genom. Na základě této metodiky se genetické účinky odhadují pro každý marker zvlášť a následně jsou sečteny. Dochází tedy k predikci celkové plemenné hodnoty zvířat. U referenční populace zvířat se záznamy o fenotypech a genotypech markerů se odhadují účinky markerů. Pro tuto metodu je esenciální technologie DNA čipů, která poskytují informace o desetitisících míst na chromosomech zvířat.

Genomická selekce využívá genotypování s vysokou hustotou k zachycení široké škály genetických variant distribuovaných napříč genomem. Tyto markery jsou kombinovány s fenotypovými a rodokmenovými daty v sofistikovaných statistických modelech, což umožňuje přesné předpovědi plemenné hodnoty zvířete (Hayes et al. 2009).

Využívají se jednonukleotivé polymorfismy (SNP), které mají přímý účinek na QTL, nebo jsou ve genové vazbě s příslušným QTL. Při tomto přístupu se odhaduje individuální účinek každého markeru a aditivní součet všech účinků se používá pro výpočet genomicky odhadovaných plemenných hodnot (GEBV) každého jedince (Meuwissen et al. 2016).

Hlavní výhodou je to, že genomická selekce přináší výrazné zkrácení generačního intervalu ve srovnání s tradičním šlechtěním a také minimalizuje náklady spojené s rozsáhlou fenotypizací, čímž následně urychluje genetický zisk (Luan et al. 2009). Využitím vazebné nerovnováhy mezi markery a kauzálními variantami zvyšuje genomická selekce přesnost

selekce, a to i u znaků s nízkou dědivostí nebo u obtížně měřitelných fenotypů (Hayes et al. 2009).

U dojeného skotu má genomická selekce hluboký dopad na genetické zlepšení. Přesným předpovídáním genomické plemenné hodnoty zvířete pro produkci mléka, plodnost, zdravotní vlastnosti a funkční vlastnosti umožňuje genomická selekce chovatelům optimalizovat genetickou výbavu jejich stád. Usnadňuje výběr zvířat s vyšší mléčnou užitkovostí, zdravím vemene, zvýšenou plodností a větší odolností vůči chorobám. To vše vede k větším ziskům a udržitelnosti mlékárenského průmyslu (Cole et al. 2011).

Genomická selekce také transformovala programy chovu masného skotu tím, že umožnila selekci zvířat s vynikajícím růstem, kvalitou jatečně upraveného těla a odolností vůči chorobám. Genomické informace pomáhají při identifikaci otců a matek s požadovanými vlastnostmi, což umožňuje získání následné generace s vyšší užitkovostí. Navíc umožňuje cílený výběr vlastností souvisejících s adaptací na prostředí, jako je tepelná tolerance nebo konverze krmiva, které jsou klíčové pro udržitelnost produkce (Saatchi et al. 2012).

Genomové technologie každým dnem postupují vpřed a je tedy možné očekávat, že se genomická selekce bude dále rozšiřovat. Budou integrovány další genomická data, které mohou být doplněny o další odvětví molekulární genetiky jako je transkriptomika a epigenetika. Bylo by tedy možné dosáhnout dalšího zlepšení přesnosti genomických předpovědí. Začlenění funkční genomiky a editace genomu otevírá cesty pro přímou manipulaci s genetickým potenciálem skotu (Cole et al. 2011; González-Recio et al. 2012; Van Eenennaam et al. 2019)

## **2.9 Mastitida**

Zánět mléčné žlázy je zánětlivé onemocnění, které je způsobeno širokým spektrem patogenů. Nejčastěji se jedná o bakteriální původce, ale může být způsoben méně častými enviromentálními patogeny jako jsou kvasinky, plísně a řasy. Toto onemocnění se od ostatních zvířecích onemocnění liší tím, že hned několik různých bakterií je schopno infikovat vemeno. Tyto patogeny napadají vemeno, dochází k množení a produkci škodlivých látek. To vše vede k tvorbě zánětu (Oliver et al. 1995).

Mastitidu můžeme rozdělit na klinickou a subklinickou. Klinická mastitida má výraznější projevy než subklinická mastitida. Je možné pozorovat zarudnutí, otok, horkost a zvýšenou

citlivost vemena. Mléko má vodnatý vzhled a je možné pozorovat sraženiny a hlavním indikátorem je zvýšený počet somatických buněk. U subklinické mastitidy obvykle nejsou pozorovány žádné příznaky. V přítomnosti infekce se vemeno jeví jako normální. Subklinická forma je častější oproti klinické formě (Sinha et al. 2014).

Při propuknutí zánětu v reakci na infekci dochází ke snížení produkce, ale nejsou viditelné žádné abnormality v žláze nebo mléce. Je proto důležité, aby byla infekce na jakékoliv úrovni identifikována a léčena co nejdříve (Sordillo et al. 1997).

Mastitida má obvykle multifaktoriální původ a důležitými faktory, které predisponují zvířata k mastitidě, jsou nádoj mléka, plemeno, manažerské a environmentální faktory, sezóna a genetické faktory (Zhang et al. 2016; Badami et al. 2019).

Během mastitidy dochází ke zvyšování počtu somatických buněk a snižování kvality a produkce mléka, která způsobuje největší ekonomické ztráty. Mastitidy stojí mlékárenský průmysl a chovatele ročně miliardy dolarů hlavně kvůli vyřazenému mléku z infikovaných krav, vyřazování krav, antibiotickým terapiím a veterinárním nákladům (Elmaghraby et al. 2018). Mastitida je dnes nejdůležitějším onemocněním v mlékárenském průmyslu, protože je odpovědný za přímé i nepřímé ztráty (Feßler et al. 2010).

Kromě finančních důsledků mastitidy by neměla být opomíjena ani její důležitost ve vztahu k veřejnému zdraví.

Ukazatel	2016	2017	2018	2019	2020
Nízká užitkovost	8,7	8,3	8,1	8,4	8,2
Vysoký věk	1,0	1,0	0,9	1,1	1,1
Ostatní zootechnické důvody	6,3	6,1	12,1	15,9	17,2
<b>Zootechnické důvody celkem</b>	<b>16,0</b>	<b>15,4</b>	<b>21,1</b>	<b>25,4</b>	<b>26,5</b>
Poruchy plodnosti	21,5	19,6	17,7	19,8	20,6
Těžké porody	10,1	10,0	10,3	9,7	10,4
Onemocnění vemene	8,5	9,3	10,2	11,1	11,6
Ostatní zdravotní důvody	43,9	45,7	40,7	34,0	30,9
<b>Zdravotní důvody celkem</b>	<b>84,0</b>	<b>84,6</b>	<b>78,9</b>	<b>74,6</b>	<b>73,5</b>

*Pramen: ČMSCH, a. s.*

*<sup>1)</sup> bez krav vyřazených z důvodu zrušení KU*

Obrázek 15 – Příčiny vyřazování krav z kontroly užitkovosti v ČR v letech 2016-2020 (Bucek et al. 2020)

Od roku 2016 do roku 2020 můžeme pozorovat nárůst vyřazení dojnic z KU z důvodu onemocnění vemene o přibližně o 3 %, i přes skutečnost, že vyřazování ze zdravotních důvodů celkem kleslo o více než 10 % (Bucek et al. 2020).

Hlavním nástrojem v boji proti zánětu mléčné žlázy jsou antibiotika. Na mléčných farmách se běžně užívají antibiotika jako penicilin, cefalosporin, streptomycin, tetracyklin a mnoho dalších se používá k léčbě a prevenci mastitid. Mezi výhody patří nižší výskyt onemocnění, snížení nemocnosti a mortality. Na druhé straně ale to vše vede ke vzniku bakterií, u kterých se vyvinula rezistence vůči antimikrobiálním látkám, což může mít dopad na léčbu nemocí postihující i lidskou populaci. Kromě toho je také mléko od krav léčených na mastitidu spojeno s vyšším výskytem reziduí antibiotik v mléce (Ruegg et al. 2005).

Pro diagnostiku mastitidy v terénních podmínkách se nejčastěji využívají nepřímé metody, jako jsou Kalifornský test mastitidy (CMT), Laurylethersulfát sodný Test (SLST), Surf field test mastitidy (SFMT), Whiteside test (WST). Somatické buňky jsou indikátory odolnosti i vnímavosti krav k mastitidám a lze je využít ke sledování úrovně nebo výskytu mastitidy ve stádech nebo jednotlivých zvířatech (Sharma et al. 2011).

### **2.9.1 Počet somatických buněk a skóre somatických buněk**

Somatické buňky v mléce jsou hlavně epiteliální buňky vylučující mléko, které jsou vyloučeny z výstelky žlázy a bílé krvinky, které vstoupily do mléčné žlázy v reakci na poranění, nebo infekci. Mléčné somatické buňky zahrnují 75 % leukocytů (neutrofilů, makrofágy, lymfocyty erythrocyty) a 25 % epiteliální buňky. Epiteliální buňky se normálně uvolňují a obnovují se během laktace, avšak během infekce se jejich počet zvyšuje. Bílé krvinky slouží jako obranný mechanismus v boji proti infekci a pomáhají při regeneraci poškozené tkáně. Během zánětu mléčné žlázy je hlavní nárůst somatických buněk způsobem přílivem neutrofilů do mléka. Hodnota množství somatických buněk v mléce je charakterizována pomocí počtu somatických buněk (SCC, somatic cell count). V mléce zdravé mléčné žlázy je SCC nižší než  $10^5$  buněk/ml, zatímco u mléčné žlázy zasažené infekcí dochází ke zvýšení SCC nad  $10^6$  buněk/ml (Harmon, 1994; Bytyqi et al. 2010; Sharma et al. 2011).

Somatické buňky v mléce se dají stanovit pomocí přímé mikroskopické metody, kde se jedná o vizuální počítání somatických buněk pod mikroskopem po obarvení. Jedná se o časově náročný postup, který se nepoužívá z důvodu dostupnosti více automatizovaných metod.

Průtoková cytometrie je široce používaná technika pro stanovení SCC. Jedná se o značení somatických buněk v mléce fluorescenčními barvivy. Buňky prochází průtokovým cytometrem, který analyzuje jejich velikost a intenzitu fluorescence. Tato metodika poskytuje rychlé a přesné výsledky, což umožňuje vysokou analýzu velkých souborů vzorků (Schukken et al. 2011).

Elektrická vodivost (EC) mléka koreluje s SCC. Zařízení na bázi EC měří elektrickou vodivost mléka a odhaduje SCC. Tato metoda je velmi rychlá a jednoduchá, postrádá ale přesnost a správnost jiných metoda je nevhodnější pro účely screeningu (Norberg, 2005).

Impedance-based Cell Counters (Čítače buněk založené na impedanci) je metoda využívající elektrickou impedanci k odhadu SCC. Vzorky mléka procházejí úzkým kanálem a zaznamenávají se změny impedance způsobené buňkami v mléce. Tato metoda je automatizovaná a poskytuje rychlé výsledky (Sobahi et al. 2020).

PCR metody se využívají pro amplifikaci genových sekvencí specifických pro somatické buňky pomocí příslušných primerů. Metody jsou velmi citlivé a přesné. Metody qPCR poskytují kvantitativní výsledky. Tyto metody vyžadují specializované vybavení a odborné znalosti (Deb et al. 2013). Současně náklady pro tyto jsou příliš nákladné na běžné používání v chovech.

Dalším indikátorem somatických buněk je skóre somatických buněk (SCS – somatic cell score), který je přímo dovozen z SCC podle vzorce  $SCS = \log_2(SCC/100\ 000) + 3$ . Tento indikátor se využívá kvůli zjednodušení a žádoucím statistickým vlastnostem (normalita) (Norman et al. 2000). Porovnání SCS a SCC charakterizuje obrázek 16.

SCS	SCC (cells/ml)
0	12,500
1	25,000
2	50,000
3	100,000
4	200,000
5	400,000
6	800,000
7	1,600,000
8	3,200,000
9	6,400,000

$${}^1\text{SCS} = \log_2(\text{SCC}/100,000) + 3; \text{SCC} = 2^{(\text{SCS} - 3)}(100,000).$$

Obrázek 16 – Ekvivalentní hodnoty SCS a SCC (v dolní tabulce je uveden převodní vzorec) (Norman et al. 2000)

## 2.9.2 Původci mastitidy

V této části literární rešerše budou krátce představeny vybrané infekční patogenní organismy, které byly v rámci disertační práce monitorovány u dojnic Českého strakatého skotu. Jedná se o nejvíce časté bakteriální patogeny, které způsobují zánět mléčné žlázy. Řada z nich způsobuje i další závažná onemocnění skotu.

### 2.9.2.1 *Staphylococcus spp.*

*Staphylococcus* je významný rod bakterií zahrnující až 50 druhů. Jedná se o grampozitivní, nesporulující bakterie. Jejich metabolismus je založen na fakultativně anaerobních reakcích. Stafylokoky se mohou dělit podle toho, zda produkují koagulázu – enzym, který mění fibrinogen na fibrin a brání se tak proti mechanismům imunitního systému (Bagnicka et al. 2021).

Nejvýznamnějším druhem ve vztahu nejen k zánětu mléčné žlázy u skotu je *Staphylococcus aureus*. Jde o grampozitivní nesporulující bakterie s kulovitým tvarem buněk, které jsou uspořádané do shluků nebo hroznových shluků. Hraje velkou roli v mlékárenském průmyslu, kde způsobuje značné ekonomické ztráty (Pereira et al. 2011). Může způsobovat



chronické a přetrvávající infekce, což z něj dělá hlavní problém pro chovatele mléčného skotu (Schukken et al. 2009).

*Staphylococcus aureus* má několik faktorů, které obcházejí imunitní reakci hostitele a přetrvávají déle v mléčné žláze. Jedná se o produkci toxinů a enzymů, které přispívají k poškození tkáně a tvorbě zánětu a také dokáže vytvářet biofilmy, složité struktury bakterií, které chrání bakterie před imunitním systémem hostitele i antibiotickou léčbou a současně také získávají kmeny stafylokokové kmeny bakterií rezistenci na penicilin (Keefe 2012; Bardiau et al. 2016).

Mastitida způsobená *Staphylococcus aureus* má často vliv na produkci a kvalitu mléka. Infikované krávy mají sníženou dojivost, dochází ke změnám ve složení mléka a počtu somatických buněk a infekce je šířena mezi dojnicemi během dojení (Pereira et al. 2011).

#### **2.9.2.2 *Corynebacterium bovis***

*Corynebacterium bovis* je enviromentální patogen běžně se vyskytující v půdě a podestýlce. Jedná se o grampozitivní bakterii a patří do čeledi *Corynebacteriaceae*. Vyskytuje se jako krátké až středně velké tyčinky nebo kokobacily, typicky uspořádané jednotlivě, v párech nebo krátkých řetězcích (Blagitz et al. 2013).

Bakterie je považována za obligátního aeroba, vyžadující kyslík pro růst a metabolismus. Pro energii využívá různé zdroje, včetně cukrů, organických kyselin a alkoholů. Zatímco je tento patogen považován za méně běžný ve srovnání s jinými bakteriemi, stále může způsobit mírné až středně závažné případy klinické mastitidy u krav. Bakterie proniká do vemene strukovým kanálkem, především z důvodu kontaminace z prostředí. Faktory, jakou jsou nesprávné hygienické postupy a poranění struků, mohou zvýšit riziko zánětu mléčné žlázy tímto patogenem. Jakmile se *Corynebacterium* usadí ve vemeni, může způsobit mírnou až středně těžkou klinickou mastitidu charakterizovanou zánětem mléčné žlázy a změnami kvality mléka. (Watts et al. 2000).

#### **2.9.2.3 *Mycoplasma spp.***

*Mycoplasma spp.* patří do třídy *Mollicutes* a jedná se o patogeny skotu, které způsobují řadu infekcí dýchacích cest, zánětů mléčné žlázy a kloubních infekcí. Jedná se o velmi malé bakterii bez buněčné stěny s pleomorfním tvarem, od koků po vláknité formy. Je to jeden z nejmenších volně žijících mikroorganismů o velikosti přibližně 0,2 až 0,3  $\mu\text{m}$  v průměru. Druhy

*Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* a *Mycoplasma bovigenitalium* mohou kolonizovat a pronikat do mléčné žlázy a způsobovat klinické a subklinické mastitidy (Maunsell et al. 2011).

Nejvýznamnějším a nejčastějším druhem je *Mycoplasma bovis*, která postihuje nejčastěji dýchací systém, kde způsobuje zápal plic a bronchopneumonii. Může také napadnout mléčnou žlázu, což vede ke klinické a subklinické mastitidě, stejně jako infikovat klouby, což vede k artritidě a kulhání (Nicholas a Ayling, 2003).

Patogen se primárně šíří přímým kontaktem mezi infikovanými zvířaty, včetně respiračních sekretů, mléka a kontaminovaných předmětů. Stresující podmínky, jako je přeprava a přeplněnost, mohou zhoršit šíření bakterie ve stádech a mezi nimi. *Mycoplasma bovis* má schopnost adherovat a kolonizovat respirační epitel a mléčnou žlázu. Zde produkuje různé virulentní faktory, včetně adhezínů a cytotoxických molekul, které přispívají k patogenitě a vyhýbání se imunitní odpovědi hostitele (Nicholas a Ayling, 2003, Maunsell et al. 2011)

#### **2.9.2.4 *Enterococcus spp.***

Enterokoky jsou grampozitivní bakterie ve tvaru koků, vyskytující se jednotlivě, v párech nebo krátkých řetězcích. Jsou to fakultativní anaeroby a jsou schopny přežít a růst v široké škále podmínek prostředí. Enterokoková mastitida je běžným problémem ve stádech dojeného skotu, který vede k ekonomickým ztrátám a problémům s léčbou (Róžańska et al. 2019).

Druhy *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus durans* byly identifikovány jako původci mastitidy u skotu. Tyto bakterie mohou být součástí mikroflóry gastrointestinálního traktu a mohou se šířit do vemene fekální kontaminací nebo kontaminovaným dojícím zařízeními. Enterokoky mají stejně jako *Staphylococcus aureus* schopnost tvořit biofilmy, čímž se zvyšuje jejich rezistence a odolnost vůči léčbě a imunitní obraně. Záněty jsou proto často chronické a opakující se. Bakterie také mají schopnost přilnout k epiteliálním buňkám mléčné žlázy, kde produkují virulentní faktory, včetně adhezínů, faktorů souvisejících s biofilmem a enzymů, které přispívají k poškození tkání (Seligsohn et al. 2021; Kim et al. 2022).

### **2.9.2.5 *Streptococcus dysgalactiae***

*Streptococcus dysgalactiae* je grampozitivní bakterie, vyskytující se v párech koků a řetězcích. Patří do rodu *Streptococcus* a jedná se o fakultativně anaerobní organismus. U skotu dochází k napadání sliznice vemene a horních dýchacích cest. Patogeneze zahrnuje přilnutí k epitelu vemene, kolonizaci a invazi uvnitř tkáně vemene. Dochází k produkci adhezínů, extracelulárních enzymů (hyaluronidáza, streptokináza) a toxinů, které poškozují tkáň a způsobují zánět. Bakterie způsobuje klinickou i subklinickou mastitidu, která vede k výrazným ekonomickým ztrátám. K přenosu infekce dochází přes kontaminované předměty a současně tak může dojít k infekci mezi zvířaty. K zamezení nákazy je důležité dodržování správných hygienických postupů během dojení, správnou přípravou struků a rychlé ošetření postižených krav. V některých stádech lze také zavést vakcinaci (Shome et al. 2012).

### **2.9.2.6 *Streptococcus uberis***

*Streptococcus uberis* je grampozitivní a anaerobní bakterie. Buňky mají tvar koků a vyskytují se v párech nebo v řetězcích. Tato bakterie je všudypřítomná kolonizuje zvířecí hostitele a jejich prostředí. Přítomnost těchto bakterií byla prokázána v dutině ústní, bachoru, dýchacích cestách, mandlích, ve strukových kanálcích, vemeni a výkalech. K šíření nejčastěji dochází přes sliznice trávicího traktu. Dále také přispívají výkaly k šíření v životním prostředí (Krömker et al. 2014).

*S. Uberis* je schopen přilnout a napadnout epitel mléčné žlázy a enzymy silně ovlivňují šíření infekce. Tato bakterie je schopna tvořit hyaluronidázu, která zlepšuje pohyb patogenu v tkáních. Přechodí prodělané a přetrvávající infekce zvyšují riziko nákazy *S. Uberis*. Nejčastěji dochází ke klinické a subklinické mastitidě a *S. Uberis* je klasifikován jako hlavní enviromentální patogen. Streptokoky z prostředí zodpovědné za jednu třetinu případů klinické mastitidy u skotu (Hillerton et al. 2003; Almeida et al. 2011; Krömker et al. 2014).

### **2.9.2.7 *Streptococcus agalactiae***

*Streptococcus agalactiae* je grampozitivní bakterie, která má tvar koků, vyskytujících se v obvykle v řetězcích. Způsobuje klinickou i subklinickou mastitidu. Tento patogen napadá mléčnou žlázu skotu, ale jeho přítomnost může být také v gastrointestiálním traktu skotu a prostředí (lůžko krávy, podlahy, vodní kanály). Patogen se primárně dostává do mléčné žlázy

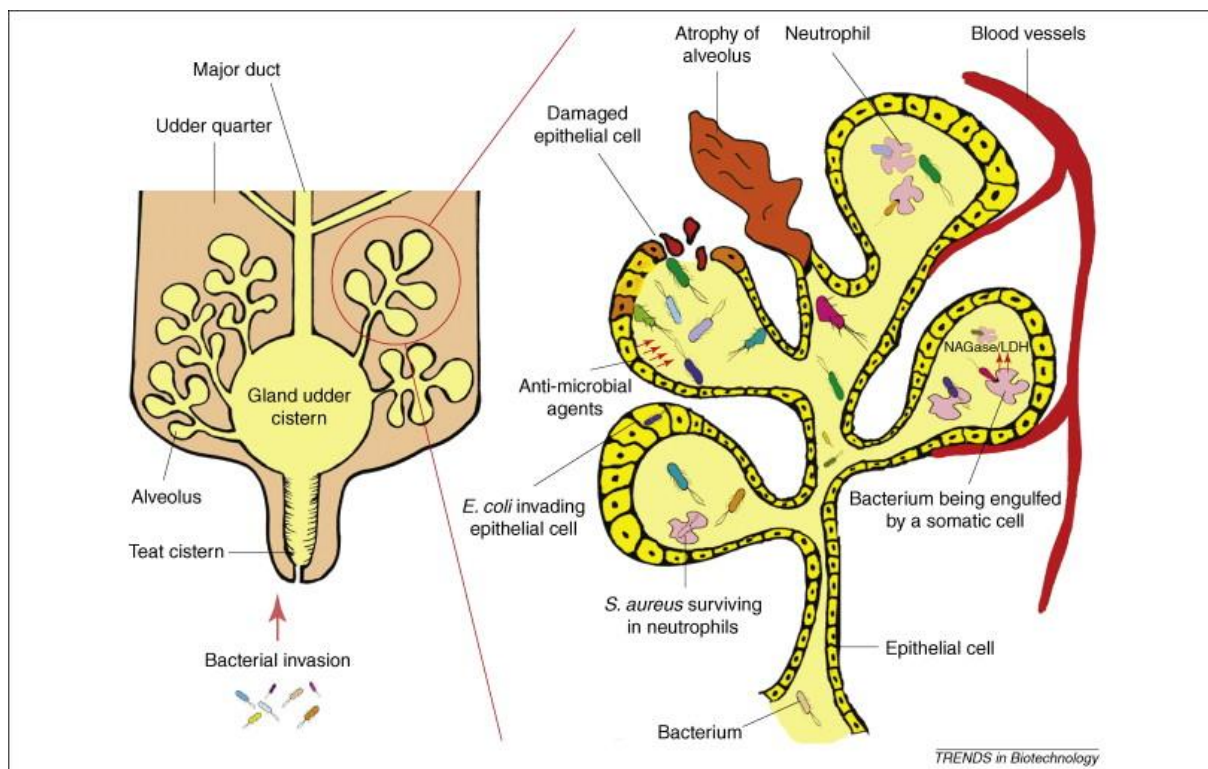
strukovým kanálkem a následně adhezuje v epitelu mléčné žlázy, přičemž produkce metabolitů vyvolává intenzivní zánětlivou reakci a poškození tkáně (Tong et al. 2019).

To vše má za následek snížení produkce mléka. Velká část infikovaných krav nevykazuje žádné zjevné známky onemocnění, jako je abnormální mléko, ale mají vysoký počet somatických buněk a sníženou produkci mléka. Infikované krávy jsou vždy zdrojem nových infekcí. Při nedodržení hygienických postupů dochází k infekci dalších dojnic při dojení (Tong et al. 2019; Bonsaglia et al. 2023).

#### **2.9.2.8 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) je tyčinkovitá, bičíkatá, gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakterie je fakultativně anaerobí a kolonie mohou růst v široké škále podmínek prostředí. Nachází se běžně v gastrointestinálním traktu skotu, ale některé kmeny mohou způsobovat mastitidu a další onemocnění. Mastitida způsobená *E. Coli* je velmi častým a významným problémem u stád dojnic (Gröhn et al. 2004).

K mastitidě dochází několika možnými cestami, včetně vzestupu bakterií strukovým kanálkem, kontaminací prostředí, nebo z jiných infikovaných míst krávy. K rizikovosti velmi přispívají faktory hygieny a hygienických opatření při dojení. Bakterie po kolonizaci mléčné žlázy produkuje látky, které poškozují tkáň a způsobují zánět (Barkema et al. 2006;). Jedná se většinou o subklinickou mastitidu, která ale v některých případech může vést k závažným případům (Sun et al. 2021).



Obrázek 17 – Schéma charakterizující napadení mléčné žlázy bakterií *E. Coli* (Viguiet et al. 2009)

### 2.9.2.9 *Prototheca spp.*

*Prototheca* je rodem jednobuněčných achlorofylních řas patřících do čeledě *Chlorellaceae*. Je známo, že tyto řasy mohou způsobovat infekce u různých zvířat a lidí. Tyto organismy se běžně vyskytují v půdě, vodě a organické hmotě. Při infekci skotu patří mezi nejčastěji postižená místa mléčná žláza, kůže, oči, uši a klouby. Zvláště *Prototheca mastitis* je významným problémem u mléčného skotu. Struktura buněčné stěny je složena z glukanu a chitinu. Patogenita se vyznačuje odolností proti imunitní reakci hostitele a produkcí fosfolipáz a proteináz, které narušují tkáň hostitele (Rakesh et al. 2006, Bozzo et al. 2014). Studie Kurumisawa et al. (2018) naznačuje, že výskyt bovinní nákazy může být spojen s přetrvávající infekcí ve střevech a zdrojem nákazy tedy může být stolice.

### 2.9.2.10 *Klebsiella spp.*

*Klebsiella* je rod gramnegativní bakterií a mezi nejznámější zástupce patří *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*. Tyto výhradně patogenní bakterie mohou infikovat mimo velké množství jiných druhů také mléčnou žlázu skotu. *K. pneumoniae* a *K. oxytoca* jsou nejrozšířenější druhy u mastitidy mléčného skotu (Massé et al. 2020).

Přenášejí se kontaktem se struky, především prostřednictvím hnoje, podestýlky a dalšího vybavení farmy. Napadají epitelální buňky mléčné žlázy, kde přetrvávají po dlouhou dobu. Kromě toho tyto kmeny nejen vážně ovlivňují kvalitu mléka a užitkovost dospělých krav, ale také představují fatální hrozbu pro přežití novorozených telat (Cheng et al. 2020; Komatsu et al. 2021).

Pod tlakem antibiotické selekce jsou geny na rezistenci proti léčbě přenášeny do jiných kmenů prostřednictvím mobilních genetických elementů (MGE), jako jsou plazmidy, transpozomy a inzerční elementy, čímž se zvyšuje náročnost boje s bakteriálními infekcemi (Yang et al. 2021).

#### **2.9.2.11 *Trueperella pyogenes* a *Peptoniphilus indolicus***

*Trueperella pyogenes* je grampozitivní, nepohyblivá, nesorotvorná tyčinkovitá bakterie, která se běžně nachází v urogenitálním a gastrointestinálním traktu mnoha živočišných druhů. Mikrobiální napadení hostitele však může vést k řadě hnisavých onemocnění (Narayanan et al. 1998; Jost et al. 2005).

U mléčného skotu způsobuje hnisavý zánět mléčné žlázy zvaný letní mastitida, které jsou spojeny s nejvyššími počty somatických buněk v mléce, velkými ztrátami mléčné užitkovosti a vysokým procentem nefunkční zasažené čtvrti vemene (Malinowski et al. 2006; Gröhn et al. 2004).

*Peptoniphilus indolicus* je gramnegativní bakterie ve tvaru koků. Jedná se o striktně anaerobní asacharolytickou bakterii, patřící do čeledi *Peptoniphilaceae*. Tato bakterie se vyskytuje samostatně, v párech, nebo krátkých řetězcích a shlukách. U skotu způsobuje, nejčastěji v kombinaci s *Trueperella pyogenes*, kravskou letní mastitidu. U telat způsobuje v kombinaci s *T. pyogenes* artritidu v několika kloubních tkáních.

#### **2.9.2.12 Kvasinky**

Jedná se o jednobuněčné organismy, patřící do říše Hub (*Funghi*). Jsou rozšířeny v půdě, rostlinách, vodě a také v trávicím a reprodukčním systému zvířat. Navzdory k jejich pouze mírnému patogennímu potenciálu jsou kvasinky zodpovědné za různé infekce u lidí a zvířat. Oslabený imunitní systém hostitele, dysbalance bakteriální mikroflóry a dlouhé využívání antibiotik jsou hlavními predisponujícími faktory pro výskyt infekce. Kvasinky jsou považovány za relativně vzácného původce mastitidy v chovem. Nejčastěji je původcem mastitidy

diagnostikován druh *Candida*. Klinická kvasinková mastitida se projevuje otokem a bolestí vemene a také změnami mléka a konzistence. Kvasinkové infekce se většinou stávají chronickými a infikovaná zvířata dále vylučují infekční organismy a dochází k další kontamiaci zařízení pro dojení a šíření infekce v rámci stáda (Crawshaw et al. 2005; Abou-Elmagd et al. 2011; Costa et al. 2012).

#### **2.9.2.13 *Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* je pohyblivá, gramnegativní, tyčinkovitá bakterie. Je označována za oportunní patogen, který je zřídka spojen s primární infekcí. U lidí je tato bakterie zřídka spojena s primární infekcí a produkuje infekci u pacientů, kteří mají narušenou imunitní odpověď. V chovech se *S. marcescens* nachází v půdě a rostlinné hmotě (včetně krmiva) a k nákaze mléčné žlázy dochází kvůli kontaktu vemene s infikovaným prostředím. Tyto bakterie mohou vytvářet biofilmy, které ulpí na faremních a dojících zařízeních. Dochází také k produkci tepelně odolné enzymů, které vedou ke kažení mléka v různých fázích zpracování. Kontaminace prostředí způsobuje propuknutí hromadných infekcí ve stádech. Velká část krav nevykazuje známky klinické mastitidy (Ruegg et al. 1992; Friman et al. 2019).

### **3 Vědecké hypotézy a cíl práce**

#### **3.1 Vědecké hypotézy:**

- 1) Hodnoty zdravotních znaků sledované přímo v chovech skotu, jako je např. obsah somatických buněk, výskyt mastitid a onemocnění paznehtů, jsou vedle faktorů vnějšího prostředí ovlivněny především genetickým založením jedince.
- 2) Proměnlivost a efektivnost imunitní odpovědi na patogenní vlivy a odolnost zvířete přímo souvisí s polymorfismem vybraných genů imunitního systému.

#### **3.2 Cíl práce:**

Analýza genetických markerů z oblasti imunitního systému u skotu a odhad jejich vlivu na ukazatele zdraví nebo plodnosti. Studium variability kódující oblasti genů signální dráhy TLR receptorů u vybrané populace dojnic českého strakatého skotu.

#### **3.3 Místo řešení:**

Disertační práce bude realizována na oddělení Genetiky a šlechtění hospodářských zvířat ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhříněvsi. Práce byla financována z projektu Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZE-RO 0718.



## **4 Materiál a metodika**

Disertační práce navazuje na výsledky sekvenování nové generace (NGS) z diplomové práce Diverzita vybraných složek Toll signální dráhy v systému přirozené imunity u českého strakatého skotu.

### **4.1 Odběr vzorků a izolace DNA**

Pro disertační práci bylo využito 164 DNA vzorků býků Českého strakatého skotu. Tyto vzorky byly izolovány pomocí sady MagSep Tissue kit (Eppendorf, Hamburk, Německo) z inseminačních dávek dodaných chovatelským družstvem Impuls. V rámci disertační práce bylo odebráno 823 vzorků chlupových cibulek dojníc Českého strakatého skotu. Odběry byly provedeny ve čtyřech chovech: Agra Březnice a.s. Zemědělská společnost Zhoř a.s. Farma Netluky, účelové hospodářství Výzkumného ústavu živočišné výroby, v. v. i. ZEOS Kamenice, s.r.o. Genomická DNA byla izolována sadou GeneAll SV mini (Gene All, Soul, Jižní Korea).

Přibližně 20 chlupových cibulek bylo přidáno do zkumavky o objemu 1,5 ml. Dle návodu Handbook for CELL SV MINI (Gene All, Soul, Jižní Korea) byla navržena na základě testování metodika, která vykazovala největší čistotu a koncentraci DNA. V prvním kroku bylo do zkumavky přidáno 25 µl proteinázy K (20 mg/ml) a 180 µl pufru H, který byl předem připraven z 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % SDS, 40 mM DTT. Vzorek byl vortexován, stočen a následně byl 90 minut inkubován při teplotě 56 °C za nejvyššího třepání na inkubátoru. V dalším kroku bylo přidáno 200 µl BL pufru (Gene All, Soul, Jižní Korea) a inkubováno při 56 °C za nejvyššího třepání. Po inkubaci bylo k vzorku přidáno 200 µl absolutního etanolu a vzorek byl vortexován a následně stočen.

V dalším kroku byl lyzát přesunut do zkumavky SV (Gene All, Soul, Jižní Korea) se silikátovou membránou a byl stáčen v centrifuze 1 min při rychlosti 8600 otáček/min. Po stočení byla vyměněna odběrová zkumavka za novou, bylo přidáno 600 µl BW pufru (Gene All, Soul, Jižní Korea) a následně opět stočeno 1 min při rychlosti 8600 otáček/min. Stejný postup byl aplikován s pufrům TW (Gene All, Soul, Jižní Korea).

Ve finální fázi byly zkumavky stočeny při maximální rychlosti 14 000 otáček/min, při které došlo k vypuzení zbytku pufru ze zkumavky a filtru. Následně bylo přidáno 200 µl elučního pufru AE (Gene All, Soul, Jižní Korea) a po 10 minutách inkubace byla zkumavka stočena na maximální rychlost a DNA byla vyplavena do sterilní zkumavky.

Koncentrace a čistota DNA vzorků byla stanovena spektrometricky pomocí přístroje NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Německo). Ve spolupráci s Českomoravskou společností chovatelů byly získány data z DNA čipů Illumina Bovine SNP\_chip\_V3 pro polymorfismus rs110533802 nacházející se v genu *IRAK1*. Data obsahovala genotypy od 4954 dojnic České populace holštýnského skotu, 4268 dojnic Maďarské populace holštýnského skotu a 1196 zvířat masných plemen (Limousine 365, Charolais 261, Simmental 281, Aberdeen Angus 289).

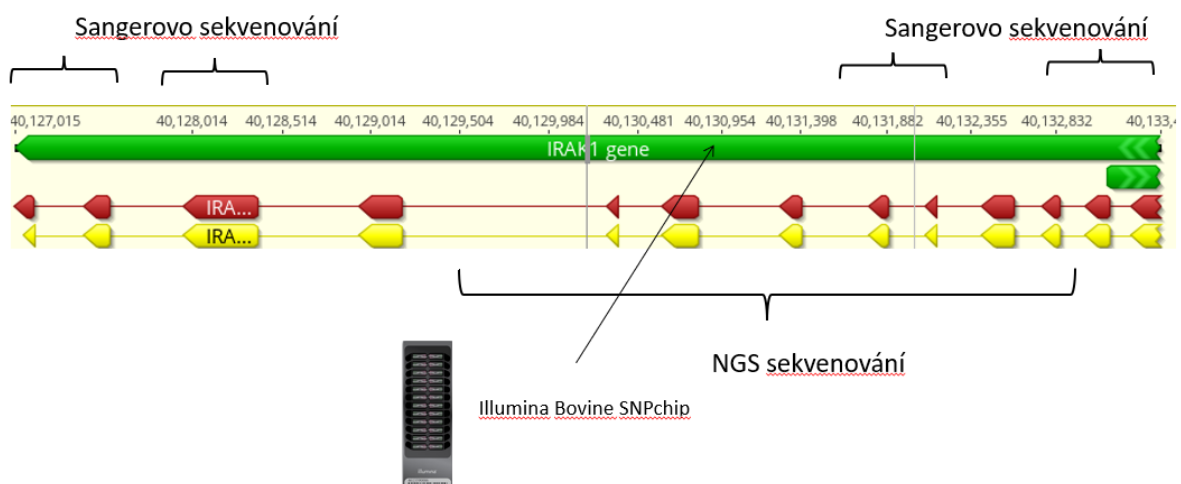
#### **4.2 Sangerovo sekvenování genu *IRAK1***

Metoda Sangerova sekvenování byla použita pro ověření výsledků NGS sekvenování a čtení regionů, které se nepodařilo touto metodou přečíst v diplomové práci (Obrázek 18). Vzhledem k absenci studií v oblasti genu *IRAK1* pro disertační práci byly navrženy nové amplifikační primery pro dané regiony o velikost kolem 700 párů bází v programu Geneious Prime pomocí funkce Design of new primers. Lyofilizované oligonukleotidy dodala firma Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Pro všechny páry primerů byly provedeny optimalizační reakce za využití gradientové PCR s rozptylem anelační teploty od 56 °C do 62 °C. Na základě výsledků optimalizace byl stanoven reakční objem na 10 µl a směs obsahovala 5 µl Basic PCR Master Mix Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika), 3,9 µl H<sub>2</sub>O určené pro PCR, 0,3 µl genomické DNA a 0,4 µl 10pmol/L každého primeru. PCR program se skládal z počáteční denaturace při 94 °C po dobu 120 s. Následně byl použit protokol pro 32 cyklů skládajících se ze 3 kroků: 1. Denaturace při 94 °C po dobu 30 s. 2. Anelace při 58 °C po dobu 30 s. 3. Elongace při 72 °C po dobu 50 s. Poslední fází byla finální elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Proces sekvenování byl proveden v servisní laboratoři Biogen (Praha, ČR) pro 164 býčích DNA vzorků. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Geneious Prime (Biomatters, Nový Zéland).

Tabulka 1. Primery pro gen *IRAK1* – Sangerovo sekvenování (Název primeru, sekvence primeru, začátek na referenční sekvenci ARS-UCD1.2 RefSeq NC 037357.1., konec na referenční sekvenci ARS-UCD1.2 RefSeq NC 037357.1.)

Název primeru	Primer Sekvence 5'→3'	Start	Konec
IK1PRIM1F	CAAGGGGTTGAGGGCCATG	37,213,463	37,213,481
IKPRIM1R	TAGGCTGGGGATGGGGAAG	37,214,097	37,214,115
IK1PRIM2F	GTCCTGGATCTCTCTCCCA	37,214,360	37,214,379
IK1PRIM2R	TCTCTTCTCTGGCCCTGACC	37,214,938	37,214,957
IK1PRIM3F	GTAGATGAGGGGGCTGGAGA	37,219,248	37,219,267
IK1PRIM3R	CCTGACGCCCCCTGACCC	317,219,909	37,219,926
IR1F1INT	TGCCAAGCGTGATACAGTGT	37,218,221	37,218,240
IR1R1INT	CAGGAGTCTCACACTGCCAG	37,218,686	37,2218,705

Obrázek 18. Strategie pro studium variability genu *IRAK1* (Zelená oblast značí referenční sekvenci genu. Červená oblast značí exony. Žlutá oblast značí kódující sekvenci). Sangerovo sekvenování pokrylo exony, které nebyly přečteny pomocí NGS sekvenování.



#### 4.3 Studium populační variability polymorfismu rs110533802 za použití metody DNA čipů

Technika genotypování na DNA čipech byla provedena ve spolupráci s Českomoravskou společností chovatelů (ČMSCH, a.s., Hradištko, ČR). Pomocí DNA čipů bylo v laboratoři iGeneticky (ČMSCH, a.s., Hradištko, ČR) hybridizováno na DNA čip Bovine SNP50 V3 BeadChip microarray 74 dojnic Českého strakatého skotu. Tento čip obsahuje 53 218 SNPs, které jsou rozmístěny po celém genomu skotu. Předmětem analýzy byl polymorfismus rs110533802, který se nachází v intronu genu *IRAK1* (viz Obrázek 18). Dle manuálu Infinium HTS assay Reference Guide byla analýza rozdělena do tří denní procedury. První den zahrnoval amplifikaci a inkubaci DNA. Druhý den zahrnoval fragmentaci DNA, precipitaci DNA, resuspendaci DNA a následnou hybridizaci DNA na mikročip. Ve třetím dnu byly DNA čipy promyty, barveny a vyhodnoceny pomocí zařízení iScan (Illumina, San Diego, CA, USA) v softwaru GenomeStudio. Na základě spolupráce s Českomoravskou společností chovatelů a.s. bylo možné zpracovat genotypy jiných plemen skotu, které byly stanoveny v laboratoři iGenetiky v přechozích letech. Data byla zpracována doplňkovým statistickým nástrojem GeneAllex v tabulkovém procesoru Microsoft Excel pro každé plemeno zvlášť.

#### 4.4 Odhad efektu polymorfismu rs110533802 k funkčním znakům skotu

Pro výpočet odhadu efektu polymorfismu rs110533802 byla použita analýza nejmenších čtverců (GLM). Do výpočtu bylo zahrnuto 1016 dojnic holštýnské plemene ze tří chovů (Experimentální Farma Netluky – VÚŽV; Zemědělská společnost Ostřetín, Agras Bohdalov, a. s.) Genotypy dojnic pro rs110533802 byly získány ve spolupráci s Českomoravskou společností chovatelů a.s. Výběr zvířat byl limitován dostupností všech údajů o zdravotních znacích, užitkovosti a exteriéru. Všechna data byla získána ve spolupráci s oddělením Genetiky a šlechtění hospodářských zvířat využitím databáze Deníku nemocí a léčení.

Modelová rovnice pro analýzu nejmenších čtverců u exteriérových znaků:

$$y_{ijkl} = \mu + hys_i + z_j + \text{genotyp}_k + q_l + e_{ijkl}$$

Rovnice zahrnovala tyto členy:

$y_{ijkl}$  – délka struku, hloubka vemene, hodnocení končetin, hodnocení vemene, hranatost, chodivost, kondice, mléčná síla, postoj zadních končetin zezadu, rámeček, rozmístění zadních struků, šířka zádě, šířka zadního upnutí, sklon zádě, úhel paznehtu, závěsný vaz

$\mu$  – aritmetický průměr

$hys_i$  – kombinovaný efekt stáda, rok a období otelení  $i$

$z_j$  – věk při otelení

$q_l$  – počet dnů od otelení do hodnocení  $l$

$genotyp_k$  – efekt jednonukleotidové mutace  $k$ ;

$e_{ijkl}$  – residuální efekt

Modelová rovnice pro analýzu nejmenších čtverců u skóre somatických buněk:

$$y_{ijkl} = \mu + hys_i + t_j + genotyp_k + e_{ijkl}$$

Rovnice zahrnovala tyto členy:

$y_{ijkl}$  – skóre somatických buněk na první laktaci, skóre somatických buněk na druhé laktaci

$\mu$  – aritmetický průměr

$hys_i$  – kombinovaný efekt stáda, rok a období otelení  $i$

$t_j$  – třída věku

$genotyp_k$  – efekt jednonukleotidové mutace  $k$ ;

$e_{ijkl}$  – residuální efekt

#### 4.5 Detekce polymorfismů v genu TLR2 pomocí metody SNaPshot

Pro určení genotypů 10 jednonukleotidových polymorfismů v genu *TLR2* (rs68268260, rs68268250, rs55617172, rs68268263, rs68268268, rs43706433, rs68268256, rs68343167, rs43706434, rs68343168) byla použita metoda extenze primeru (Hoogendoorn et al. 1999), konkrétně komerční verze – SnaPshot (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Kódující oblast genu *TLR2* byla vymezena pomocí dvojicí primerů TLR2\_F1 (GTCATCCCCTTCTCCTCCTC) a TLR2\_R1 (AACTCCATCCCCTCTGGTCT). Finální produkt měl délku 2451 párů bází.

Extenzivní primery byly navrženy tak, aby komplementárně odpovídaly přesně k příslušné mutaci přímou, nebo reverzní orientací. Primery T2\_260\_R, T2\_250\_F, T2\_172\_F, T2\_268\_R, T2\_434\_F byly převzaty z certifikované metodiky Novák et al. (2018) a následně vhodně upraveny tak, aby odpovídaly vzdáleností multiplexové reakci. Primery byly navrženy na délku mezi 20 až 30 nukleotidy tak, aby zastoupení GC nukleotidů bylo kolem 60 %. PolyT úseky s rozdílem přibližně pěti nukleotidů byly přidány na 5'konce primerů aby bylo možné odlišit více produktů na kapilárním sekvenátoru.

Tabulka 2. Extenzivní primery pro gen *TLR2*

Název Primeru	Polymorfismus	Poloha chr. 17	Sekvence primeru
T2_260_R	rs68268260	3955648	GACTGGCCCGATGACTACC
T2_250_F	rs68268250	3957134	(5T)CCTCTGCAGGTCTCTGTTGC
T2_172_F	rs55617172	3957147	(12T)TCTGTTGCyGACATAGGTGAT
T2_263_F	rs68268263	3955341	(21T)CAGCTTAAAGGGAGGGTTGAA
T2_268_R	rs68268268	3954988	(26T)GGTTAAATTTGAGAGCTGCAATAA
T2_433_F	rs43706433	3956705	(30T)ATCTACAAGAATGTCCACGAGTAAAA
T2_256_R	rs68268256	3956086	(36T)TTTGCTTACTCTGGAAAATCTGAATA
T2_167_R	rs68343167	3956358	(43T)GCATATTCCACAGTTTTTCTTATTCA
T2_434_F	rs43706434	3956881	(49T)AGCTGTTACTATTTCTACTTTTAGGGTC
T2_168_F	rs68343168	3956326	(56T)TACTGTTTTCTATTGTGACTCTTTAACT

PCR reakce pro SNaPshot analýzu byla provedena v objemu 10,6  $\mu$ L pro každé zvíře zvlášť a reakční směs se skládala z 6  $\mu$ L DreamTaq™ Hot start Green PCR mix (Thermoscientifics), 0,3  $\mu$ L 10pmol/L každého primeru, 5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O určené pro PCR, 0,5  $\mu$ L genomické DNA. PCR program se skládal z počáteční denaturace při 95 °C po dobu 180 s. Následně byl použit program obshující 30 cyklů a skládajících se ze 3 kroků: 1. Denaturace při 95 °C po dobu 30 s. 2. Anelace při 58 °C po dobu 30 s. 3. Elongace při 72 °C po dobu 150 s. Poslední fází byla finální elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Následně bylo 2,5  $\mu$ L PCR směsi inkubováno při 37 °C po dobu 1 hodiny s 0,5  $\mu$ L alkalické fosfatázy SAP a 0,5  $\mu$ L Exonukleázy

EXO1. Po uplynutí inkubace byly enzymy deaktivovány v termocykléru při 80 °C po dobu 15 min.

Poté byla připravena SNaPshot reakce v objemu 5 µl. Reakční směs obsahovala 1,5 µl přečištěného PCR produktu, 2,5 µl SNaPshot ready reaction mix, 0,5 µl 10pmol/L směs extenzních primerů a 0,5 µl H<sub>2</sub>O určené pro PCR. SNaPshot PCR program zahrnoval 25 cyklů s třemi kroky. 1. krok – denaturace při 95 °C po dobu 10 s. 2. krok – anelace při 50 °C po dobu 5 s. a 3. krok – elongace při 60 °C po dobu 30 s.

Po ukončení PCR bylo 5 µl inkubováno s 0,5 µl alkalické fosfatázy po dobu jedné hodiny a enzymy deaktivovány v termocykléru při 80 °C po dobu 15 min. Pro denuraci bylo připraveno 0,5 µl přečištěné PCR směsi doplněno o 9 µl HIDI formamidu a 0,5 µl LIZ 120 standart do sekvenační destičky o 96 jamkách a denaturováno při 95 °C po dobu 5 min.

Denaturovaný produkt byl vložen do sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) a byla použita fragmentační analýza. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Geneious Prime. Touto metodou bylo analyzováno 823 dojnic Českého strakatého skotu.

#### **4.6 Stanovení populačních charakteristik polymorfismů v genu *TLR2***

Výsledné tabulky byly převedeny do vhodného formátu pro nástroje určené k výpočtu populačních charakteristik. Populační charakteristiky (frekvence alel a genotypů, efektivní počet alel, zjištěná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, Chí kvadrát test pro Hardy-Weinbergovu rovnováhu, fixační index) byly vypočítány v doplňku Microsoft Excel GenAIEx 6.5 software (Peakall and Smouse, 2012).

#### **4.7 Vyhodnocení efektu polymorfismů**

Z deníku nemocí a léčení skotu byla získána data o výskytu mastitidy v chovech Českého strakatého skotu. Každé zvíře bylo vyhledáváno v datových souborech a údaje o mastitidách byly zaznamenávány do excelovského souboru. Z databáze Plemdat (ČMSCH a.s., Hradištko, ČR) byly získány dostupné informace o genotypovaných zvířatech. Z databáze plemdat byly také vyneseny informace o důvodu vyřazení dojnic, které byly vyřazeny v průběhu naší studie.

Všechna získaná data byla použita pro analýzu účinku jednotlivých polymorfismů v genu TLR2 v programu SAS (SAS institute). Byla využita matematicko-statistická metoda nejmenších čtverců – GLM. Jako nejvhodnější model byl zvolen model s třemi třídami: stádo, rok narození zvířete a genotyp příslušného zvířete. Jako závisle proměnná byla zvolena mastitida na první laktaci.

Pro detailnější vyhodnocení byla použita metoda BLUP animal model. Modelová rovnice sestávala z následujících efektů:

$$y_{ijkl} = \mu + rok_i + stádo_j + genotyp_k + a_l + e_{ijkl}$$

kde:

$y_{ijkl}$  – zaznamenané případy klinické mastitidy (0,1 – 6) případů na první a druhé laktaci

$\mu$  – aritmetický průměr populace

$rok_i$  – efekt roku prvního otelení i

$stádo_j$  – efekt stáda otelení j

$genotyp_k$  – účinek SNP k

$a_l$  – aditivní genetický efekt krávy l (rodokmen zahrnoval 2 638 zvířat)

$e_{ijkl}$  – je residuální efekt

#### **4.8 Návrh a optimalizace metody HRM pro polymorfismy rs29017188 a rs8193069 v genu TLR4**

Pro determinaci genotypů v polymorfismech rs29017188 a rs8193069 v genu *TLR4* byly navrženy dvě dvojice primerů o délce přibližně 150 párů bází. K ověření metody bylo nutné vytvořit dvojice primerů pro Sangerovo sekvenování, které by posloužilo k validaci výsledků HRM analýzy. Tyto primery byly navrženy v program Geneious prime (Biomatters, Nový Zéland).

Pro polymorfismus rs8193069 byly navrženy primery pro HRM: T4\_HRMS\_F se sekvencí TGCTGGCTGCAAAAAGTATG a T4\_HRMS\_R se sekvencí CCCTGTAGTGAAGGCAGAGC. Tento pár primerů měl výslednou velikost produktu 149 bp. Sekvenační primery byly vybrány:



T4\_SEMS\_F se sekvencí GTTTCAGGAACGCCACTTGT a T4\_SEMS\_R se sekvencí TTACGGCTTTTGTGGAAACC. Tyto primery vymezily region o velikosti 334 bp.

Pro detekci polymorfismu rs29017188 byly vytvořeny primery pro HRM: T4\_HRPR\_F se sekvencí GCCAGCTTCCTCTTGTTGTT a T4\_HRPR\_R se sekvencí GGTTACGGGAGGAGAGGAAG a ohraničily region o velikosti 156 bp. Sekvenační primery byly vybrány: T4\_SEPR\_F se sekvencí AAAGCCACAGTTCCTGGGTA a T4\_SEPR\_R se sekvencí TGGCTCTGTGAAAGCATGAC. Tyto primery ohraničili region o velikosti 374 bp.

Lyofilizované oligonukleotidy dodala firma Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Pro sekvenační páry primerů byly provedeny optimalizační reakce za využití gradientové PCR s rozptylem anelační teploty od 56 °C do 62 °C. Na základě výsledků optimalizace byl stanoven reakční objem na 10 µl a směs obsahovala 5 µl Basic PCR Master Mix Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika), 3,9 µl H<sub>2</sub>O určené pro PCR, 0,3 µl genomické DNA a 0,4 µl 10pmol/L každého primeru.

PCR program se skládal z počáteční denaturace při 94 °C po dobu 120 s. Následně byl použit program s 32 cykly skládajících se ze 3 kroků: 1. Denaturace při 95 °C po dobu 30 s. 2. Anelace při 58 °C po dobu 30 s. 3. Elongace při 72 °C po dobu 30 s. Poslední fází byla finální elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Proces sekvenování byl proveden v servisní laboratoři Biogen (Praha, ČR) pro 96 DNA vzorků dojnic. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Chromas (Technelysium, South Brisbane, Austrálie).

Pro detekci polymorfismu rs8193069 byla reakční směs s objemem 20 µl složena z 10 µl LightCycler 480 High Resolution Melting Master pufru, 1 µl 4 µM mixu primerů T4\_HRMS\_F a T4\_HRMS\_R, 2 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> a 2 µl H<sub>2</sub>O PCR grade. Poté došlo k promíchání vzorku a přidání 4 µl 10ng/µl genomické DNA a 1 µl 10ng/µl „wild-type“ homozygotního vzorku DNA (tento doporučený krok byl zvolen na základě metodiky High Resolution Melting: Optimization Strategies (Roche, Mannheim, Německo)).

Pro stanovení polymorfismu rs29017188 byla reakční směs o objemu 20 µl složena z 10 µl LightCycler 480 High Resolution Melting Master pufru, 1 µl 4 µM mixu primerů T4\_HRPR\_F a T4\_HRPR\_R, 2 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> a 2 µl H<sub>2</sub>O PCR grade. Následovalo promíchání a přidání 4 µl 10ng/µl genomické DNA a 1 µl 10ng/µl „wild-type“ homozygotního vzorku DNA (na základě metodiky High Resolution Melting: Optimization Strategies (Roche, Mannheim, Německo)).

Analýza byla provedena v zařízení LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Německo). Nejprve byla použita standartní PCR amplifikace. Prvním krokem byla preinkubace po dobu 10 minut při teplotě 95 °C. Poté následovalo opakování 45 cyklů, kde každý cyklus obsahoval denaturační fázi, anelační fázi a elongační fázi. Denaturační fáze trvala 10 sekund při 95 °C. Anelační fáze byla nastavena na 15 s při teplotě 60 °C pro oba páry primerů příslušných polymorfismů. Elongační fáze trvala 15 s (odpovídající délce fragmentů) při teplotě 72 °C.

Následoval program určený na HRM analýzu. Program byl nastaven na počáteční denaturační krok na 1 minutu při 95 °C. Poté došlo ke snížení teploty na 40 °C po dobu jedné minuty. Teplotní rozmezí tání se upravilo na interval od 72 °C do 90 °C při zvyšování teploty o 0,02 °C/s. Po skončení programu byly výsledky podrobeny analýze modulem Gene Scanning Softwaru LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Německo) a na základě odlišnosti křivek tání byly vyhodnoceny genotypy.

Po získání výsledků Sangerova sekvenování a HRM analýzy byly výsledky mezi sebou validovány a byla vyžadována 100 % shoda pro určení genotypů z obou použitých metod.

#### **4.9 Stanovení původců mastitid v mléce dojnic ČESTR na experimentální farmě Netluky**

Na experimentální farmě Výzkumného ústavu živočišné výroby v Netlukách byl sledován výskyt původců mastitid u dojnic Českého strakatého skotu. Do sledovacího procesu bylo zařazeno 25 dojnic a odběry byly prováděny každý sudý měsíc po kontrole užitkovosti. Dojnice byly vybírány na základě množství somatických buněk v mléce. V průběhu experimentu byla část dojnic vyřazena zootechnikem a docházelo tedy k obměňování kontrolovaných zvířat.

##### **4.9.1 Aseptický odběr vzorků mléka**

Experiment probíhal na dojárně experimentální farmy Netluky. Aseptický odběr probíhal během dojení všech stád. K vybraným zvířatům se přicházelo hned při vstupu zvířete k dojícímu zařízení. Na struky vemene byl okamžitě aplikován pre-dip (jodový přípravek k dezinfekci struků před dojením). Následně bylo z každého struku minimálně dvakrát odstříknuto. Poté byly struky důkladně očištěny sterilní gázou namáčenou v 70 % ethanolu. Po úplném očištění struků byl proveden odběr do sterilních odběrových zkumavek. Začínalo se od nejvzdálenějšího struku, aby se minimalizovala šance na kontaminaci při odebírání mléka

z dalších struků. Před každým odběrem bylo minimálně třikrát odstříknuto mimo odběrovou zkumavku a následně byla zkumavka naplněna minimálně na 3 ml. Odběrové zkumavky byly přesunuty do chladicího boxu. V laboratořích byly vzorky kontrolovány před viditelnou kontaminací (kus výkalu, mále části podestýlky) a následně byly uloženy do lednice. Vzorky s viditelnou kontaminací byly odstraněny z experimentu.

#### **4.9.1 Izolace bakteriální DNA**

K izolaci bakteriální DNA byla použit modifikovaný postup kitu Cell SV mini (Gene All, Soul, Jižní Korea). Při izolaci se pracovalo s 1,5 ml mléka. Nejprve byly vzorky stáčeny v centrifuze při 13 000 otáčkách/min po dobu 15 minut. Následně byla z vrchu zkumavky odebrána vrstva tuku a obsah zkumavky byl vylit do odpadní nádoby. Následně se přidalo 180 µl lysozymu (30 mg/ µl) a pelet utvořený na spodu zkumavky se resuspendoval pipetou.

Vzorek byl poté inkubován při 37 °C po dobu 60 min při nejvyšším třepáním. V dalším kroku se k vzorku přidalo 25 µl proteinázy K (20 mg/ml) a vzorek byl zvortexován a opět inkubován po dobu jedné hodiny při teplotě 56 °C. Vzorek byl doplněn o 200 µl BL pufru (Gene All, Soul, Jižní Korea), vortexován a inkubován po dobu 60 min při teplotě 56 °C. Po uplynutí doby inkubace byla teplota zvýšena na 95 °C na 15 min.

Vzorek byl následně zchlazen na pokojovou teplotu a po stočení k němu bylo přidáno 200 µl absolutního etanolu. Poté byla obsah přesunut na SV kolonku (Gene All, Soul, Jižní Korea) a stočen po dobu 1 min při 8600 otáčka/min. Tento krok se opakoval s 600 µl BW pufru a 700 µl TW pufru (Gene All, Soul, Jižní Korea). Po přečištění příslušnými pufrů byl vzorek stočen 1 min při maximální rychlosti a k uvolnění DNA z filtru do sterilní zkumavky bylo použito 100 µl AE pufru (Gene All, Soul, Jižní Korea). Vzorky byly stočeny při maximální rychlosti a pro větší koncentraci DNA byl obsah zkumavky nanesen znovu na filtr a opět stočen při maximálních otáčkách v centrifuze.

#### **4.9.2 Detekce původců mastitidy metodou qPCR**

Pro detekci původců mastitidy v mléce dojníc ČESTR byl použit kit VetMAX™ MastiType Multi Kit (Waltham, Massachusetts, USA), který umožňuje rychlou a přesnou detekci patogenů v mléce skotu pomocí PCR v reálném čase. Tento kit detekuje 15 patogenů a stafylokokový gen beta-laktamanázy (rezistence na antibiotikum penicilin) ve čtyřech samostatných PCR reakcích. Mezi patogeny patří: *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus spp.* *Escherichia coli*,

*Klebsiella oxytoca* a *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.* *Prototheca spp.* *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Trueperella pyogenes* a *Peptoniphilus indolicus* a kvasinky.

Pro analýzu jednoho vzorku byly připraveny čtyři multiplexní reakce. Směs pro jeden multiplex obsahoval vždy 10 µl Mastitype Master mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) a 5 µl MastiType Multi Primer Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) s příslušným číslem 1–4. Směsi multiplexů byly řádně promíchány špičkou a rozpipetovány do destičky určené pro qPCR. Do destičky bylo následně přidáno 5 µl DNA získané z čerstvého mléka. Každý multiplex qPCR reakce zahrnoval vzorky s pozitivní a negativní kontrolou – 5 µl MastiType positive Control (PC) (Applied Biosystems) a 5 µl H<sub>2</sub>O určené pro PCR, která sloužila jako negativní kontrola (Mastitis Negative Control (MNC)).

V softwaru 7500 Software v2.3 (Applied Biosystem) byl navržen design destičky dle manuálu VetMAX™ MastiType Multi Kit (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, Massachusetts, USA), dle příslušných multiplexů pro jednotlivé skupiny patogenů. qPCR byla realizována v real-time termocykléru 7500 Real-time PCR systém (Applied Biosystems).

V prvním kroku PCR programu byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu 10 minut. Poté následovalo 40 cyklů, které se skládaly ze 2 kroků. Prvním krokem byla denaturace při 95 °C po dobu 5 s. Druhým krokem byla anelace a elongace při 60 °C po dobu 1 min.

V softwaru 7500 Software v2.3 (Applied Biosystem, Waltham, Massachusetts, USA) byly analyzovány křivky reakcí a následně vyhodnoceny přítomnosti jednotlivých patogenů. Jako prahovou hodnotu (Threshold value, C<sub>t</sub>) byla dle metodiky VetMAX™ MastiType Multi Kit (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, Massachusetts, USA) zvolena hladina C<sub>t</sub>= 37 cyklů. Vyšší hodnoty křivek nebyly brány jako průkazné.

## **5. Výsledky a diskuze**

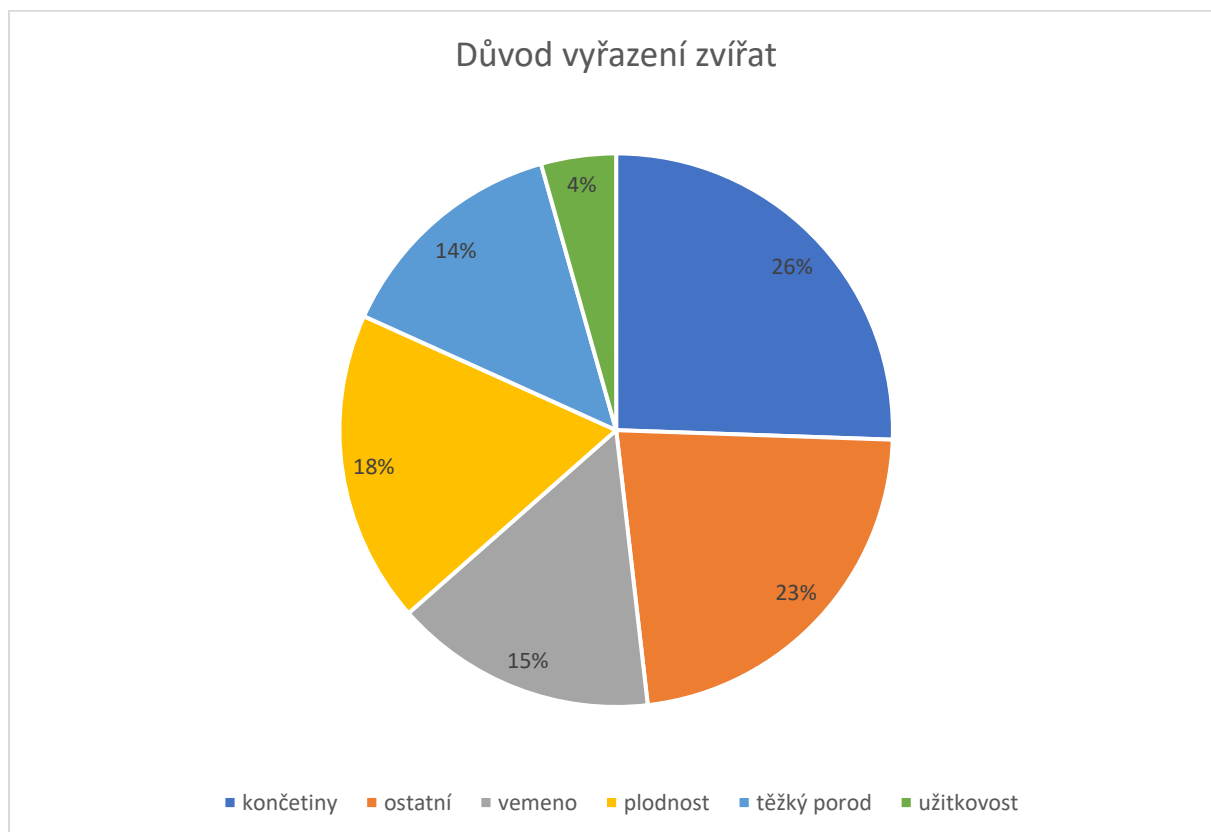
### **5.1 Odběr vzorků a izolace DNA**

Odběry ve stájích byly realizovány pomocí sedmi výjezdů do podniků Agra Březnice a.s. Zemědělská společnost Zhoř a.s. Farma Netluky, účelové hospodářství Výzkumného ústavu

živočišné výroby, v. v. i. ZEOS Kamenice. Vzorky byl přímo ve stáji tříděny do uzavíratelných plastových pytlíků, aby nedocházelo k vzájemné kontaminaci vzorků.

Z dat v databázi Plemdat (ČMSCH a.s., Hradištko, ČR) byla vytvořena tabulka, která obsahovala všechna potřebná data. Během studie byla část dojnic vyřazena z různých důvodů. Tyto důvody jsou vyobrazeny na následujícím obrázku.

Obrázek 19 – Důvody vyřazení sledovaných dojnic z chovu



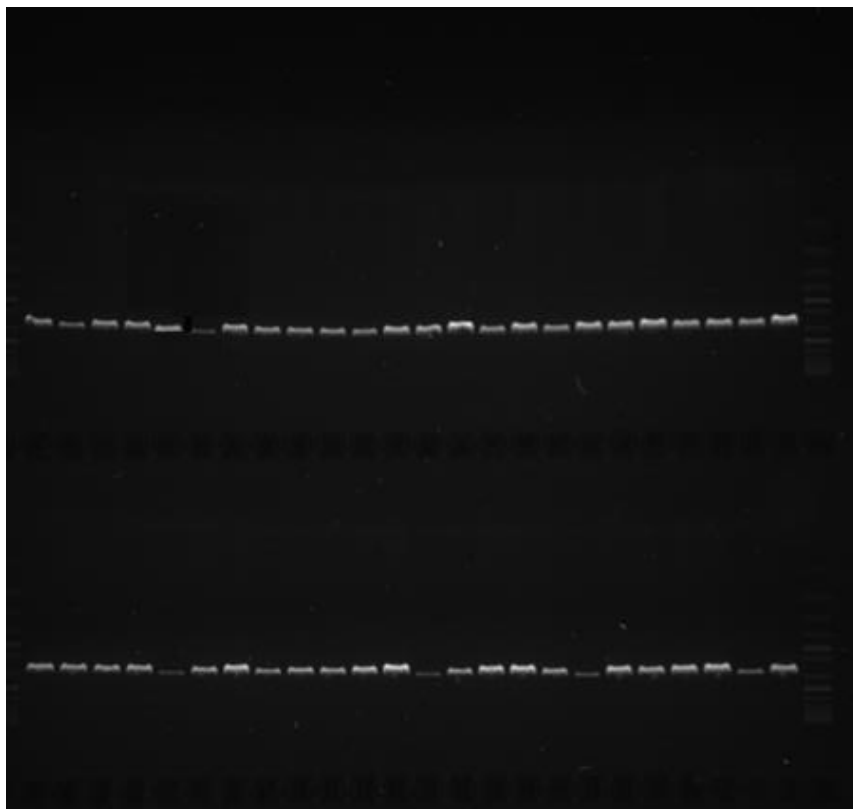
V době ukončení studie bylo vyřazeno 137 dojnic. Nejvíce dojnic (35) bylo vyřazeno z důvodů onemocnění končetin, 31 dojnic bylo vyřazeno z ostatních zootechnických důvodů, 25 z důvodu komplikací souvisejících s plodností, 21 na základě zdravotního stavu vemene, 19 dojnic z důvodů těžkých porodů a 6 z důvodu nízké užítkovosti.

Data je možné porovnat s důvody vyřazování krav z kontroly užítkovosti v ČR v roce 2020 (Bucek et al. 2020). V naší sledované populaci ČESTR bylo nejvíce dojnic vyřazeno z důvodů onemocnění končetin – 26 %. Bucek et al. 2020 neuvádí přímo statistiku pro onemocnění končetin, ale tyto data spadají pod ostatní zdravotní důvody, které činily 30,9 %. Z ostatních zootechnických důvodů bylo ze stád, které jsme sledovali vyřazeno 23 % dojnic

oproti 18,3 % vyřazení v ČR v roce 2020. Vyřazení z důvodu poruch plodnosti bylo zastoupeno 18 % oproti celkové statistice ČR – 20,6 %. Těžký porod činil 14 % oproti celkovým 10,4 % pro ČR za rok 2020. Onemocnění vemene činilo v roce 2020 v ČR 11,6 % z celkových důvodů vyřazení z kontroly užitkovosti. V naší sledované populaci se jednalo o 15 %. Z důvodů nízké užitkovosti byla v naší sledované populaci vyřazeno 4 % dojnice, proti celkové statistice ČR 8,2 %.

## 5.2 Sangerovo sekvenování genu *IRAK1*

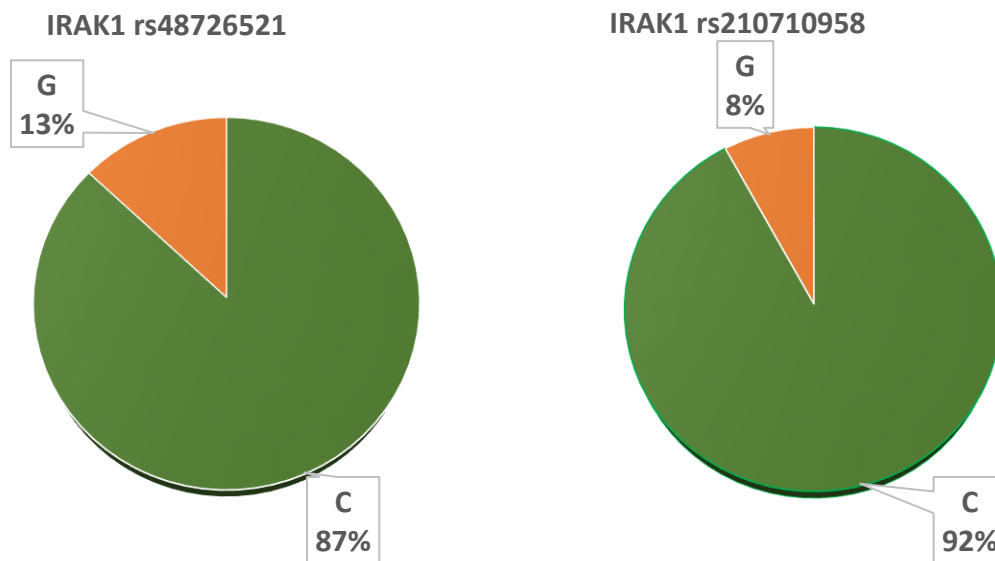
Optimální anelační teplota pro všechny primery byla stanovena na 58 °C. Při této teplotě nevznikaly žádné vedlejší produkty. Amplifikace fragmentů určených k sekvenování proběhla u všech DNA vzorků úspěšně. Všechny vzorky byly podrobeny elektroforetické kontrole na agarózovém gelu (viz. Obrázek 20).



Obrázek 20 – Kontrola fragmentů PCR s primery IR1F1INT a IR1R1INT 48 býků ČESTR

Výsledky Sangerova sekvenování neodhalily přítomnost žádných dalších polymorfismů v genu *IRAK1*. Sekvenování fragmentů označených primery IR1F1INT a IR1R1INT odhalila přítomnost polymorfismů rs210710958 a rs48726521, které se nacházejí v intronu genu.

Mutovaná alela G polymorfismu rs210710958 byla reprezentována s alelickou frekvencí 8 %.  
Mutovaná alela G polymorfismu rs48726521 byla přítomna s frekvencí 13 %.



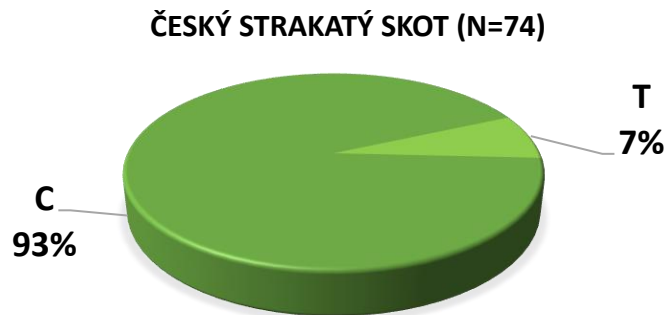
Obrázek 21 – Alelická frekvence polymorfismů rs210710958 a rs48726521 u 164 býků ČESTR

Na základě výsledků NGS sekvenování a následným výsledkům Sangerova sekvenování regionů, lze konstatovat, že diverzita v genu *IRAK1* je v populaci Českého strakatého skotu omezená v porovnání s diverzitou genů Toll-like receptorů. Studie Cargill a Womack (2007) uvádí nalezení 130 jednonukleotidových mutací a 9 delecí při sekvenování genů *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* a *TLR9*. Rovněž během studie Bilgen et al. (2016) bylo za využití sekvenování 10 dojnic Holštýnského skotu nalezeno pro gen *TLR2* 45 variant, pro gen *TLR6* 155 variant a pro gen *TLR4* 74 variant.

Nízký nález polymorfismů je také v kontrastu s vysokým počtem SNP v databázích European Variation Archive (EBI) a Ensembl. Velký důraz byl kladen na potvrzení nově nalezeného nesynonymního polymorfismu G/A na pozici 40132145, ale Sangerovo sekvenování přítomnost této nové mutace nepotvrdilo.

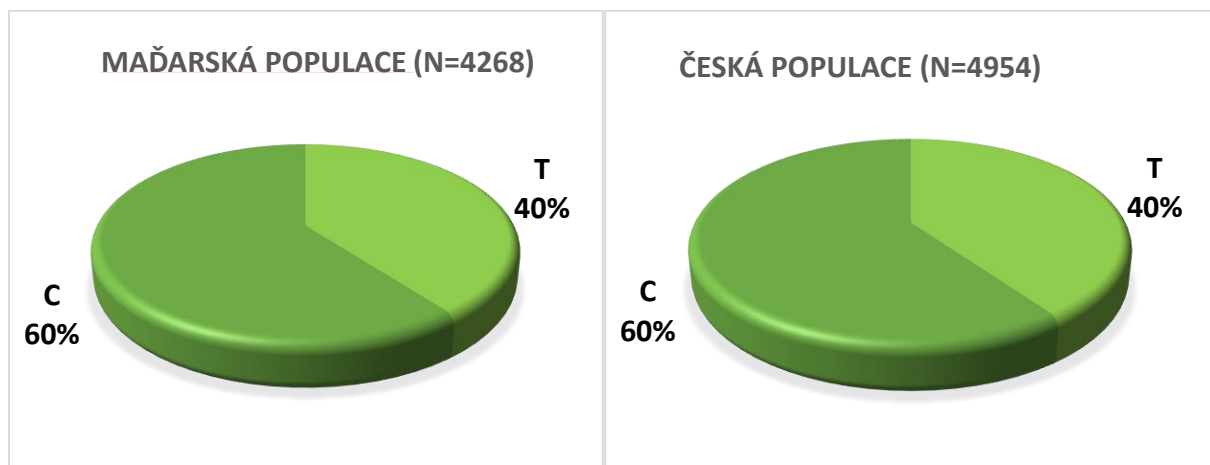
### 5.3 Studium populační variability polymorfismu rs110533802 za použití metody DNA čipů

V disertační práci bylo analyzováno 74 dojnic Českého strakatého skotu pomocí metody DNA čipů. Sonda ARS-BFGL-NGS-107270 na čipu Illumina Bovine SNP\_chip\_V3 odpovídá intronovému polymorfismu C/T rs110533802. U studované populace ČESTR byla zjištěna alelická frekvence mutované alely T 7 % (viz obrázek 22).



Obrázek 22 – Alelická frekvence polymorfismu rs110533802 v populaci ČESTR

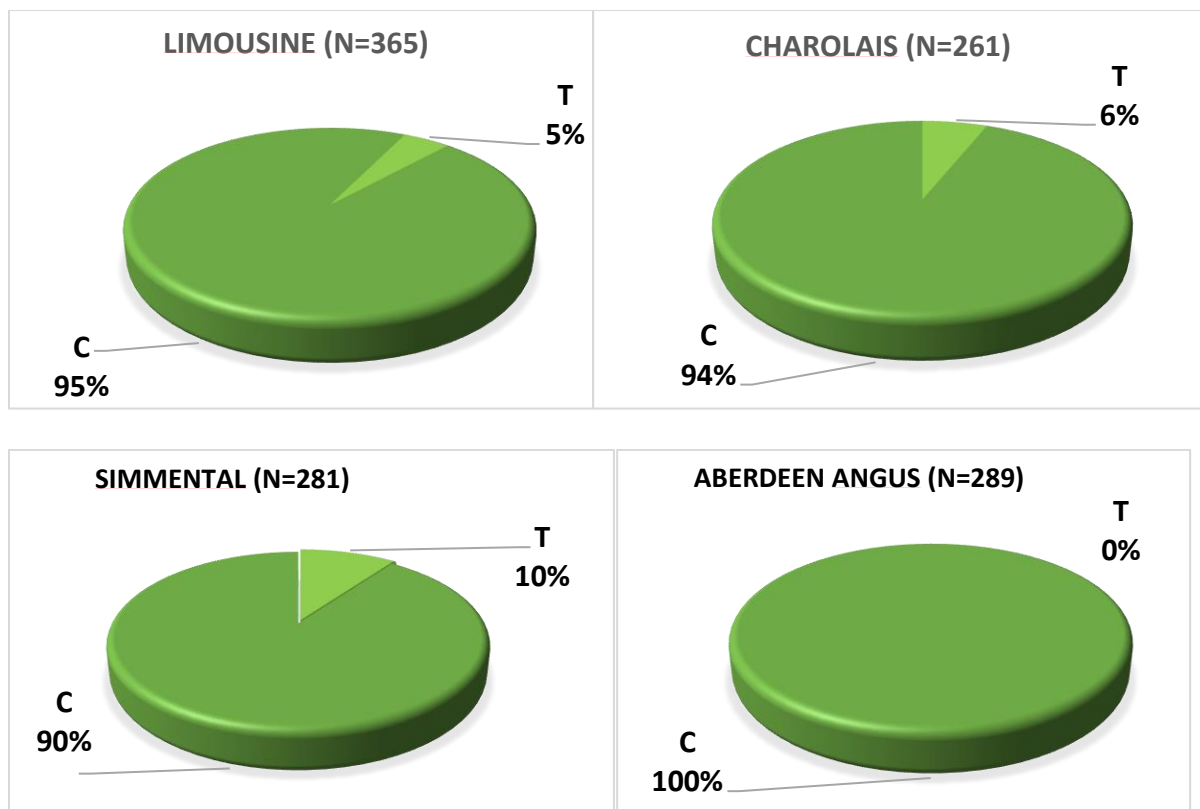
Data poskytnutá Českomoravskou společností chovatelů umožnila porovnání populace ČESTR s dalšími populacemi plemen. Populace 4954 dojnic Holštýnského skotu na českém území vykazovala frekvenci mutované alely *T* 40 %. Stejná frekvence byla nalezena u maďarské populace 4268 dojnic Holštýnského skotu (Obrázek 23).



Obrázek 23 – Porovnání alelických frekvencí polymorfismu rs110533802 u maďarské a české populace Holštýnského skotu.

Data také umožnila porovnání variability u masných plemen (Limousine, Charolais, Simmental, Aberdeen Angus). Masná plemena vykazovala nižší alelické frekvence mezi (0-10 %). U plemena Aberdeen Angus nebyla mutovaná alela přítomna.





Obrázek 24 – Porovnání variability polymorfismu rs110533802 u masných plemen skotu

U obou Holštýnských populací byly pozorovány stejné alelické frekvence, což by mohlo být způsobeno podobnými šlechtitelskými programy a potenciálním vztahem polymorfismu rs110533802 k funkčním znakům u dojeného skotu, protože u masných plemen byl tento polymorfismus reprezentován s frekvencí 10 %. U plemena Aberdeen Angus nebyl přítomen vůbec.

Tabulka 3 – Porovnání plemen skotu pro variabilitu v polymorfismu rs110533802

Plemeno skotu	Počet dojnic (N)	Frekvence původní alely C	Frekvence mutované alely T
Český strakatý skot	74	0.93	0.07
Holštýnský skot (HU)	4268	0.60	0.40
Holštýnský skot (CZ)	4954	0.60	0.40
Limousine	365	0.95	0.05
Charolais	261	0.94	0.06
Simmental	281	0.90	0.10
Aberdeen Angus	289	1	0

Technologie DNA microarray umožnila srovnání variability polymorfismu rs110533802 v genu *IRAK1* mezi oběma holštýnskými populacemi. Obě populace holštýnského skotu obsahovaly mutantní alelu *T* polymorfismu rs110533802 s frekvencí 0,4. Tato skutečnost by mohla být způsobena šlechtitelským cílem a potenciálním vztahem polymorfismu rs110533802 k vlastnostem spojenými s mléčnou užitkovostí skotu, protože tato mutace je udržována ve vysokých frekvencích v obou populacích. Tento fakt může souviset se skutečností, že molekuly signální dráhy Toll hrají významnou roli nejen v imunitě (Caparelli et al. 2013), ale také v metabolických procesech. Výsledky studie Eberleina et al. (2011) zvýšily povědomí o funkční důležitosti *IRAK1* v několika tkáních, včetně hovězích jater, kosterního svalstva, mléčné žlázy a podkožního tuku, které se podílejí na metabolismu energie a tuků u skotu. Odlišná exprese genu *IRAK1* u zvířat s různým obsahem intramuskulárního tuku.

Naše práce prokázala, že mutantní alela *T* polymorfismu rs110533802 se vyskytovala významně méně v populacích masných plemen skotu (mezi 0-0,1) než u holštýnského plemene. Mezi 289 zvířaty Aberdeen-Angus se mutovaná alela vůbec nevyskytovala. Výsledky získané pro populaci Českého strakatého skotu byly více podobné alelickým frekvencím získaným u masných plemen skotu než u holštýnského skotu. Toto zjištění by mohlo souviset s tradiční selekcí pro dvouúčelovou užitkovost, která je stále definována v současném šlechtitelském cíli České strakatého skotu.

#### **5.4 Odhad efektu polymorfismu rs110533802 na funkční znaky skotu**

Významně vyšší výskyt mutované alely *T* u Holštýnských populací vedl k hypotéze, že tato alela bude asociovaná s mléčnou užitkovostí. Lineární modely odhalily statisticky významné rozdíly mezi genotypy pro SCS na první ( $p = 0,0436$ ) a druhé laktaci ( $p = 0,0135$ ). U lineárního popisu vemene polymorfismus rs110533802 ovlivňuje hloubku vemene ( $p = 0,0001$ ) a celkový znak hodnocení vemene ( $p = 0,0202$ ). Dále byly nalezeny statisticky významné rozdíly pro kondici ( $p = 0,0047$ ), hranatost ( $p = 0,0450$ ), rámec ( $p = 0,0134$ ) a úhel paznehtu ( $p = 0,0283$ ).

Oproti tomu statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny pro chodivost ( $p = 0,5062$ ), mléčnou sílu ( $p = 0,1759$ ), postoj zadních končetin ( $p = 0,4528$ ), rozmístění zadních struků ( $p = 0,3118$ ), šířku zádě ( $p = 0,2523$ ), šířku zadního upnutí ( $p = 0,9295$ ), sklon zádě ( $p = 0,9256$ ), úhel paznehtu ( $p = 0,9256$ ), závěsný vaz ( $p = 0,6036$ ) a hodnocení končetin ( $p = 0,6008$ ).

Tabulka 4 – Detailní výsledky pro lineární popis vemene

	CC		CT		TT	
	LS-mean	SE	LS-mean	SE	LS-mean	SE
Hloubka vemene	6,482 <sup>a</sup>	0.093	6,362 <sup>a</sup>	0.086	6,023 <sup>b</sup>	0.109
Hodnocení vemene	81,226 <sup>a</sup>	0.292	81,167 <sup>a</sup>	0.271	80,363 <sup>b</sup>	0.342

<sup>a,b</sup> – rozdílné horní indexy znamenají statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ )

Dle zjištěných výsledků původní genotyp *CC* má pozitivní vliv na hloubku vemene u sledované populace. S výskytem alely *T* klesají průměrné hodnoty pro lineární popis hloubky vemene. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi genotypy *CC* x *TT* a *CT* x *TT*.

Stejný trend výsledky potvrzují u souhrnného hodnocení vemene, kdy opět s výskytem mutované alely *T* dochází k snížení hodnoty lineárního popisu tohoto znaku. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi genotypy *CC* x *TT* a *CT* x *TT*.

Tabulka 5 – Detailní výsledky pro lineární popis exteriéru

	CC		CT		TT	
	LS-mean	SE	LS-mean	SE	LS-mean	SE
Hranatost	5,642 <sup>a</sup>	0,071	5,484 <sup>b</sup>	0,065	5,516 <sup>a,b</sup>	0,082
Kondice	4,649 <sup>a</sup>	0,076	4,875 <sup>b</sup>	0,071	4,825 <sup>b</sup>	0,089
Rámec	6,716 <sup>a,b</sup>	0,072	6,807 <sup>a</sup>	0,067	6,585 <sup>b</sup>	0,085
Úhel paznehtu	5,451 <sup>a</sup>	0,074	5,484 <sup>a</sup>	0,069	5,274	0,086 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> – rozdílné horní indexy znamenají statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ )

U lineárního popisu se opět jeví efekt původní alely *C* jako zvýhodňující pro lineární popis hranatosti, rámce a úhlu paznehtu. Oproti tomu pro lineární popis kondice se alely *C* jeví jako zhoršující.

Pro hranatost byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi genotypy *CC* a *CT*. Mezi ostatními genotypy nebyly objeveny statisticky významné rozdíly, avšak v průměrných hodnotách je vidět klesající trend s mutovanou alelou *T*.

Průměrné hodnoty lineárního popisu pro kondici naopak s přítomností mutované alely *T* zaznamenávají nárůst. Statisticky významný rozdíl byl stanoven pro genotypy *CC* x *CT* a *CC* x *TT*.

Lineární popis rámce dle výsledků zobecněných lineárních modelů zaznamenal statisticky významný rozdíl mezi genotypy *CT* a *TT*.

Pro lineární popis úhlu paznehtu, dle našich výsledků, se jeví genotyp *CC* a *CT* zvýhodňující oproti genotypu *TT*, kde byly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Tabulka 6 – Detailní výsledky pro skóre somatických buněk

	<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>	
	LS-mean	SE	LS-mean	SE	LS-mean	SE
SCC 1. laktace	2,328 <sup>a</sup>	0,102	2,552 <sup>b</sup>	0,098	2,499 <sup>a,b</sup>	0,103
SCC 2. laktace	2,433 <sup>a</sup>	0,155	2,786 <sup>b</sup>	0,142	2,796 <sup>a,b</sup>	0,177

<sup>a,b</sup> – rozdílné horní indexy znamenají staticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ )

Výsledky pro skóre somatických buněk na první a druhé laktaci odhalily stejný trend pro původní alelu *C*. U první laktace došlo k zvýšení skóre somatických buněk v souvislosti s alelou *T*. Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi genotypem *CC* a *CT*. Na druhé laktaci opět došlo ke zvýšení somatických buněk. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán mezi genotypem *CC* a *CT*. Mezi genotypy *CC* a *TT* byla zaznamenán hodnota těsně nad hladinou významnosti ( $p = 0,055$ ).

Skutečnost, že polymorfismus rs110533802 se nachází na pozici 37 217 426 na chromozomu X v intronu 8 (ARS-UCD1.2 RefSeq NC 037357.1), vyvolává otázku, jak intronová varianta může ovlivnit několik funkčních znaků. V úvahu přichází hned několik možných vysvětlení.

Intronové oblasti mohou obsahovat regulační prvky, jako jsou zesilovače nebo tlumiče, které mohou ovlivnit genovou expresi. Pokud SNP, který jsme identifikovali, spadá do regulační oblasti, mohl ovlivnit vazbu transkripčních faktorů, což by vedlo ke změnám v úrovni exprese genu *IRAK1* (Lin et al. 2014).

Introny se také účastní procesu sestřihu mRNA, kde jsou odstraněny nekódující oblasti a exony jsou spojeny dohromady, aby vytvořily konečný mRNA transkript. SNP v intronu by mohl potenciálně ovlivnit proces sestřihu, což má za následek alternativní vzory sestřihu genu *IRAK1*. Změněný sestřih může vést k různým izoformám proteinu, což může mít dopad na funkční znaky (Barralle & Giudice, 2017).

Při interpretaci asociací s intronickými variantami je nezbytné vzít v úvahu možnost vazebné nerovnováhy (Linkage Disequilibrium, LD). Vazebná nerovnováha se týká nenáhodné asociace alel na různých lokusech na stejném chromozomu. Identifikovaný SNP může být ve vazebné nerovnováze s jinou kauzální variantou (např. funkční variantou v blízkém genu), která je zodpovědná za zjištěnou asociaci.

V případě naší zjištěné asociace s rs110533802 je tedy možné uvažovat, že studovaný polymorfismus se nachází v haplotypu s jinou mutací v genu *IRAK1* a je děděn z jedné generace na další. Funkční varianty se ale mohou nacházet i na jiném odlehlém genu. Na základě zjištěných funkčních vlastností genů, byly vybrány geny, které by mohly být potenciálně zodpovědné za změny funkčních znaků.

Nejblíže genu *IRAK1* se nachází gen *MECP2* na pozici 37 283 270 -> 37 222 430 a protein kódovaný tímto genem je nezbytný pro funkci nervových buněk a má funkci potlačovat několik dalších genů (Adkins & Georgel, 2011).

Gen *HCF1* se nachází na pozici 37 183 186 -> 37 160 360 a podílí se na řízení buněčného cyklu a má regulační roli v mnoha procesech související s transkripcí (Li et al. 2008).

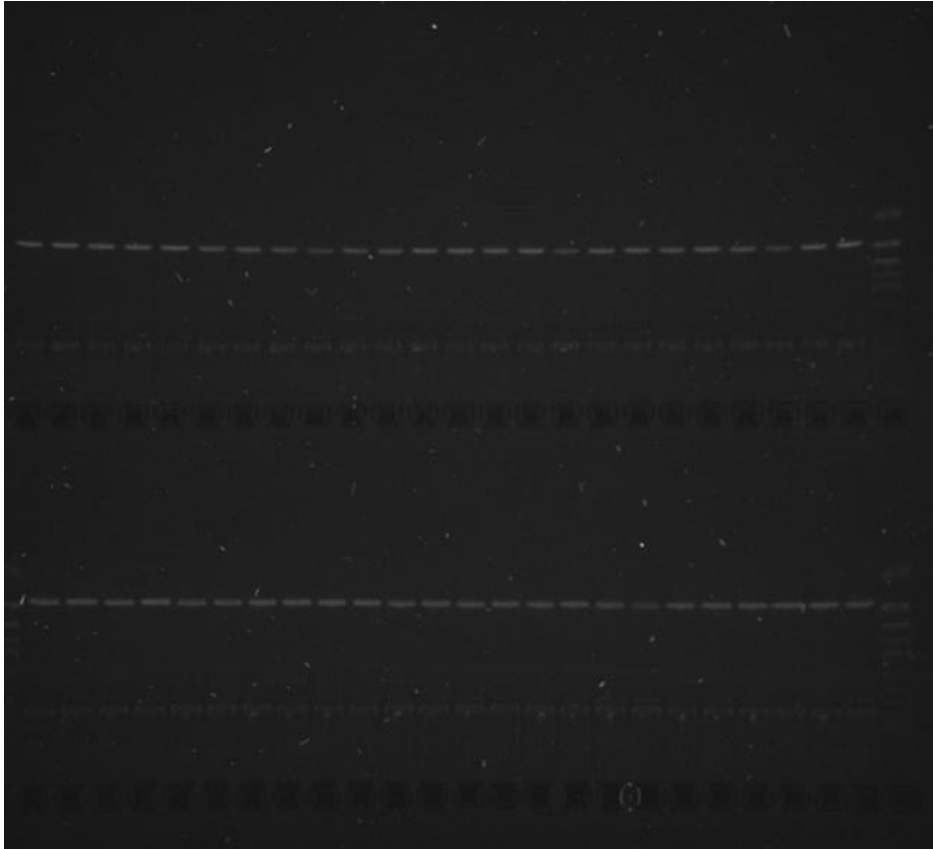
Gen *RENBP* se nachází na pozici 37 157 509 -> 37 149 900 a genový produkt inhibuje aktivitu reninu vytvořením dimeru s reninem a komplexu známého jako vysokomolekulární renin. (GeneCards, 2023).

Gen *L1CAM*, který je lokalizován na pozici 37 099 801 -> 37 076 263, je axonální glykoprotein patřící do rodiny imunoglobulinových supergenů. Tato molekula buněčné adheze hraje důležitou roli při vývoji nervového systému (GeneCards, 2023).

Přiřazení přesného kauzálního lokusu pro danou asociaci zůstává pouze teoretické. Sekvenování oblastí kolem polymorfismu rs110533802 u studované Holštýnské populace by mohlo objasnit molekulární příčinu tohoto funkčního vztahu. Je taky možné, že daný polymorfismus je ve vazbě s více lokusy zodpovědnými za jednotlivé zjištěné změny ve funkčních znacích skotu.

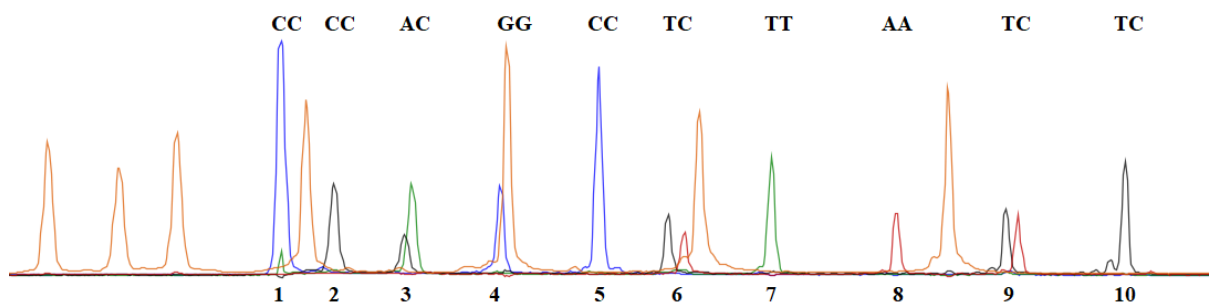
### 5.5 Detekce polymorfismů v genu *TLR2* pomocí metody SNaPshot

Optimální anelační teplota pro amplifikaci fragmentu genu *TLR2* byla stanovena na 59,2 °C. Úspěšnost PCR reakcí u jednotlivých zvířat byla kontrolována pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (viz. Obrázek 24). U 28 zvířat selhala v průběhu SNaPshot analýzy některá z procedur a vzorky musely být znovu zařazeny do procesu analýzy. V případě, že nebyla opakovaně úspěšná PCR bylo zapotřebí opakovat kolonkovou izolaci DNA.



Obrázek 25 – Kontrolní elektroforéza fragmentů PCR s primery TLR2\_F1 a TLR2\_R1

Po opakování analýz bylo genotypováno všech 780 dojnic ČESTR na 10 polymorfismů v genu *TLR2*.



Obrázek 26 – Výstup z fragmentační analýzy. Čísla označují jednotlivé polymorfismy a jejich genotyp. 1. rs68268260, 2. rs68268250, 3. rs55617172, 4. rs68268263, 5. 68268268, 6. rs43706433, 7. rs68268256, 8. rs68343167, 9. rs43706434, 10. rs68343168

Výsledky jednotlivých vzorků byly manuálně vyhodnoceny v programu Geneious Prime podle barev příslušného „peaku“. Dle oranžových „peaků“ – standardů byly odlišeny délky jednotlivých produktů. Barva „peaku“ označuje poslední nukleotid, který se přiřadil na extenzní primer (viz. Obrázek 26).

Metoda SNaPsHot se osvědčila jako robustní a přesná metoda pro určení genotypů v genu *TLR2*. V průběhu genotypování došlo k objevení úplných genových vazeb mezi sledovanými polymorfismy, kdy naše výsledky stanovily 100 % shodu u haplotypů. Tato skutečnost potvrzuje přesnost této metody. Multiplex by bylo možné doplnit o dalších 10 polymorfismů a navýšit tak kapacitu genotypování, čímž by došlo ke snížení nákladů na genotypování jedné mutace. Metodika může posloužit pro další genotypování u jiných plemen skotu.

## 5.6 Stanovení populačních charakteristik polymorfismů v genu *TLR2*

Gen *TLR2* má kódující oblast na reverzním řetězci. Polymorfismus rs68268260 způsobuje nukleotidovou záměnu C/G/T, které vede v případě c1688G>C k aminokyselinové záměně pArg563Pro. V případě mutace c.1688G>A k aminokyselinové záměně p.Arg563His. U polymorfismus rs68268250 dochází k záměně C/T, kdy mutace c.202G>A vede k změně aminokyseliny p.Gly68Ser. Polymorfismus rs55617172 způsobuje záměna C/A, přičemž mutace c.189G>T vede ke změně aminokyseliny p.Glu63Asp. U polymorfismu rs68268263 dochází k mutaci G/C u referenčního forvardového vlákna a mutace c.1995C>G na transkripčním vláknu vede k záměně aminokyselin p.His665Gln. Polymorfismus rs68268268 je

způsoben mutací C/T na referenčním vlákně, kde mutace c.2348G>A způsobuje záměnu aminokyselin p.Arg783Lys. Polymorfismus rs43706433 je dán nukleotidovou záměnou T/C a mutace c.631A>G způsobuje záměnu aminokyselin p.Ile211Val. Polymorfismus rs68268256 způsobuje záměnu T/C, kdy mutace c.1250A>G způsobuje záměnu aminokyselin p.Asn417Ser. U polymorfismu rs68343167 dochází k záměně A/T, kdy mutace c.978T>A způsobuje záměnu aminokyseliny p.His326Gln. Polymorfismus rs43706434 nabývá alel C/T, na reverzním transkripčním vlákně dochází k mutaci c.455G>A a změně aminokyselinového řetězce p.Arg152Gln. Polymorfismus rs683431168 je dán záměnou C/T, kdy mutace c.1010G>A způsobuje záměnu aminokyseliny p.Arg337Lys (Ensembl, ENSBTAT00000010530, ENSBTAP00000010530).

Byly vypočteny alelické a genotypové frekvence u všech získaných genotypů. Výsledky odhalily absolutní genovou vazbu mezi polymorfismy rs68268260, rs68268250, rs68268263, rs68268256, rs68343167, rs68343168, jelikož genotypové frekvence vždy odpovídaly počtu 690 genotypů „wild type“ homozygota, 87 pro heterozygotní jedince a 3 pro mutantní homozygotní jedince. Toto tvrzení bylo i zkoumáno detailní inspekci jednotlivých genotypů a teorie byla potvrzena. Tento souhrnný genotyp byl označen pro studii jako *SGTLR1*.

Mezi polymorfismy rs55617172 a rs43706433 byla také zjištěna absolutní genová vazba. Kdy „wild type“ homozygotní genotypy byly nalezeny s absolutní četností 161, heterozygotní genotypy s četností 386 a mutované genotypy s četností 233. Hypotéza byla testována inspekci jednotlivých genotypů se shodou. Souhrnný genotyp byl označen jako *SGTLR2*.

U polymorfismu rs68268268 nebyla nalezena přítomnost mutantní alely C a je tedy možné označit tento polymorfismus u studované populace za monomorfní (Tabulka 7). U polymorfismu nebyla nalezena vazba k dalším polymorfismům.



Tabulka 7 – Zjištěné frekvence polymorfismů genu v *TLR2*

Polymorfismus	Alela	Relativní frekvence alely	Genotyp	Absolutní frekvence genotypu	Polymorfismus	Alela	Relativní frekvence alely	Genotyp	Absolutní frekvence genotypu
rs68268260			<b>CC</b>	690	rs68268250			<b>CC</b>	690
	<b>C</b>	0,940	<b>CT</b>	87		<b>C</b>	0,940	<b>CT</b>	87
	<b>T</b>	0,060	<b>TT</b>	3		<b>T</b>	0,060	<b>TT</b>	3
rs55617172			<b>AA</b>	233	rs68268263			<b>CC</b>	3
	<b>A</b>	0,546	<b>AC</b>	386		<b>C</b>	0,060	<b>GC</b>	87
	<b>C</b>	0,454	<b>CC</b>	161		<b>G</b>	0,940	<b>GG</b>	690
rs68268268			<b>CC</b>	780	rs43706433			<b>CC</b>	233
	<b>C</b>	1,000	<b>CG</b>	0		<b>C</b>	0,546	<b>CT</b>	386
	<b>G</b>	0	<b>GG</b>	0		<b>T</b>	0,454	<b>TT</b>	161
rs68268256			<b>CC</b>	3	rs68343167			<b>AA</b>	690
	<b>C</b>	0,060	<b>CT</b>	87		<b>A</b>	0,940	<b>AT</b>	87
	<b>T</b>	0,940	<b>TT</b>	690		<b>T</b>	0,060	<b>TT</b>	3
rs43706434			<b>CC</b>	392	rs68343168			<b>CC</b>	690
	<b>C</b>	0,711	<b>CT</b>	325		<b>C</b>	0,940	<b>CT</b>	87
	<b>T</b>	0,289	<b>TT</b>	63		<b>T</b>	0,060	<b>TT</b>	3

Tabulka 8 – Vybrané populační charakteristiky pro polymorfismy v genu *TLR2*

	rs68268260	rs68268250	rs55617172	rs68268263	rs68268268	rs43706433	rs68268256	rs68343167	rs43706434	rs68343168
<b>N</b>	780	780	780	780	780	780	780	780	780	780
<b>Na</b>	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
<b>Ne</b>	1,126	1,126	1,983	1,126	1,000	1,983	1,126	1,126	1,698	1,126
<b>Ho</b>	0,112	0,112	0,495	0,112	0,000	0,495	0,112	0,112	0,417	0,112
<b>He</b>	0,112	0,112	0,496	0,112	0,000	1,983	0,112	0,112	0,411	0,112
<b>χ<sup>2</sup></b>	0,021 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>	0,002 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>	NA	0,001 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>	0,146 <sup>ns</sup>	0,021 <sup>ns</sup>
<b>F</b>	0,005	0,005	0,002	0,005	NA	0,002	0,005	0,005	-0,014	0,005

N – počet dojnic, Na – počet alel, Ne – efektivní počet alel, Ho – zjištěná heterozygotnost, He – očekávaná heterozygotnost,  $\chi^2$  – chí kvadrát test, F – Molekulární inbreeding, <sup>ns</sup> – nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (Testováno k tabulkové hodnotě Kritického rozdělení  $\chi^2$  testu při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$   $\chi^2_{tab}=3,84$ )

Tabulka 8 uvádí vybrané populační charakteristiky pro polymorfismy v genu *TLR2*. Při Chí-kvadrát testu pro Hardy-Weinbergovu rovnováhu byly vždy vypočtené hodnoty  $\chi^2$  nižší tabulkové hodnoty  $\chi^2$ . Mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi je shoda. Dané lokusy se nacházejí v genetické rovnováze.

Molekulární inbreeding se pohyboval u všech polymorfismů v nízkých hodnotách od -0,014 po 0,005 a udává o kolik procent méně heterozygotů se nachází v populaci oproti předpokladu (ideální populace při náhodném pářování). Negativní hodnoty značí přebytek heterozygotů v případě polymorfismu rs43706434 a pozitivní hodnoty značí přebytek homozygotů v porovnání s HW rovnováhou. Nízké hodnoty kolem 0 značí, že se populace nachází pro daný lokus v HW rovnováze

Studie Seabury et al. (2010) uvádí frekvenci 0,220 mutované alely *A* polymorfismu rs68268260 u 101 zvířat skotu pocházejících z 37 plemen skotu, zatímco Fisher et al. (2011) popisuje frekvenci této mutované alely pouze 0,066 u 96 zvířat.

Ve studii Bhaladhare et al. (2016), která se zabývala asociací polymorfismů v *TLR2* a boviní tuberkulózy, je u polymorfismu rs55617172 zaznamenána frekvence mutované alely *T* 0,143 u případové skupiny zvířat (N=10) a 0,286 u kontrolní skupiny zvířat (N=28). Frekvence mutované alely *T* 0,31 polymorfismu rs43706433 byla stanovena u 423 Holštýnských býků ve studii Viale et al. (2017).

Blejka et al. (2020) uvádí u polymorfismu rs68268250 frekvenci mutované alely *A* 0,3 sledovanou u 50 býků Českého strakatého skotu, pro polymorfismus rs68268260 byla nalezena frekvence mutované alely *A* 0,12 u 61 býků Českého strakatého skotu, u polymorfismu rs55617172 byla stanovena frekvence mutované alely *T* 0,51 u 49 býků ČESTR a pro polymorfismus rs43706434 byla nalezena frekvence mutované alely *A* 0,21.

Sekvenování genů TLR genů ve studii Novák et al. (2019) přináší alelické frekvence u 150 býků Českého strakatého skotu pro: mutovanou alelu *A* polymorfismu rs68268260 – 0,291, mutovanou alelu *A* polymorfismu rs68268250 – 0,171, mutovanou alelu *T* polymorfismu rs55617172 – 0,508, mutovanou alelu *A* polymorfismu rs43706433 – 0,460, mutovanou alelu *G* polymorfismu rs68268256 – 0,244, mutovanou alelu *G* polymorfismu rs68268263 – 0,1, mutovanou alelu *A* polymorfismu rs68343167 – 0,286, mutovanou alelu *A* polymorfismu rs43706434 – 0,178 a mutovanou alelu *A* polymorfismus rs68343168 – 0,306.

## 5.7 Vyhodnocení efektů polymorfismu

Díky přístupu do aplikace Deník nemocí a léčení, který je prakticky používán přímo pro evidenci dat na jednotlivých farmách, jsme vytěžili data o výskytu mastitid na prvních třech laktacích. Z databáze Plemdat ČSMSCH také další nezbytné zootechnické údaje o dojnících (datum narození, rodokmenové údaje, počet ukončených laktací, důvod vyřazení).

Metoda GLM byla použita pro každý SNP zvlášť. Zvolený model neodhalil žádné významné signifikantní rozdíly. Pouze u SNP rs43706433 byl nalezen signifikantní rozdíl u heterozygotního genotypu *TC* s *p*-hodnotou  $p = 0,0311$ . Heterozygotní dojnice s genotypem

CT (SNP rs43706433 ve 2. exonu genu TLR2, alely C/T) vykazovaly statisticky významný rozdíl ve výskytu klinické mastitidy na první laktaci. Byly k tomuto onemocnění náchylnější než dojnice s homozygotním genotypem. Metoda GLM byla použita jako prvotní analýza. Pro detailnější a přesnější hodnocení byl použit smíšený lineární model se zahrnutím rodokmenu zvířat.

Pro detailnější výpočty pomocí metody BLUP animal model byl použit vzhledem k chybějícím údajům menší počet dojnic (556).

Tabulka 9 – Vyhodnocení metody BLUP animal model

Polymorfismus / Haplotyp	genotyp	Počet genotypů	Odhad BLUP	střední chyba průměru	F hodnota
rs68268260 <i>SGTLR1</i>	CC	486	0		
	TC	69	-0,1136	0,0496	-2,2888 *
	TT	1	-0,2725	0,3742	-0,7283
rs55617172 <i>SGTLR2</i>	AA	162	0,1362	0,0375	3,6320 *
	AC	277	0	0	
	CC	117	0,0360	0,0416	0,8656
rs43706434	CC	279	0,0785	0,0343	2,2903 *
	TC	235	0		
	TT	42	0,0785	0,0631	1,2429

\* - označené hodnoty vykazují statisticky významné hodnoty

Vzhledem k absolutní genové vazbě mezi polymorfismy rs68268260, rs68268250, rs68268263, rs68268256, rs68343167, rs68343168 byl odhad proveden pouze pro polymorfismus rs68268260 a zjištěné výsledky mohou být přisuzovány celému souhrnnému genotypu (*SGTLR1*) pro tyto polymorfismy. Výsledné hodnoty byly testovány proti kritické hodnotě ( $F_t = 1,96$ ) studentova t-rozdělení pro oboustranný kritický obor při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Pro polymorfismus rs68268260 byl nalezen statisticky významný rozdíl pro heterozygotní genotyp TC, kdy heterozygotní jedinci dle našeho výpočtu vykazují statisticky významně nižší výskyt mastitidy na první a druhé laktaci oproti jedincům s genotypem CC.

Zjištěné výsledky je v tomto případě nutné přisuzovat celému souhrnnému genotypu *SGTLR1* složeného z polymorfismů rs68268260, rs68268250, rs68268263, rs68268256, rs68343167, rs68343168.

Pro polymorfismus rs5561717 byl nalezen statisticky významný rozdíl pro jedince s genotypem AA, kdy homozygotní jedinci AA vykazují statisticky významný rozdíl ve vyšším výskytu mastitidy. Tuto asociaci je opět nutné přisoudit celému souhrnnému genotypu *SGTLR2*.

Pro polymorfismus rs43706434 byla nalezen statisticky významný rozdíl mezi původním homozygotním genotypem CC a heterozygotním genotypem CT. Původní genotyp CC vykazuje statisticky významný rozdíl ve výskytu mastitidy na první a druhé laktaci.

Výzkum Bhavanirama et al. (2019) informuje o škodlivém efektu polymorfismu rs68268260 na základě SIFT skóre, kdy hladina mezi 0 – 0,05 predikuje změny funkce proteinu. Polymorfismus vede k narušení funkčnosti a stability proteinu. Tento polymorfismus dle predikce je zodpovědný za záměnu aminokyselin v LRR-funkční doméně genu *TLR2*. Rovněž studie Seabury et al. (2010) potvrzuje vliv polymorfismu rs68268260 na funkci proteinu v doméně LRR.

V práci Prebavathy et al. (2015) byla studována asociace mezi polymorfismy a výskytem boviní mastitidy. Pro detekci 6 SNP (rs55617172, rs111026127, rs68268256, rs68268260, rs68343170 a rs68268268) byla použita alelově specifická PCR. Statistická analýza asociace mezi genotypy a detekovanými případy a kontrolou vedla k identifikaci asociace polymorfismu rs55617172 ( $p=0,0328$ ) mezi TT genotypem pro SNP T/G v pozici 385 mRNA s kontrolním a heterozygotním genotypem. Existence této asociace byla potvrzena i naší studií

Tento výzkum identifikuje dále asociaci mezi SNP rs68343170 C/T v pozici mRNA 2010 ( $p=0,0006$ ) a mastitidou. Tento SNP v naší studii nebyl analyzován. Pro polymorfismy rs111026127, rs68268256, rs68268260 a rs68268268 studie neuvádí významné asociace, což je kontrastu s výsledky naší studie (Prebavathy et al. 2015).

Ze 6 studovaných polymorfismů, které vedou k záměně v aminokyselinovém řetězci v genech *TLR2* a *TLR4* byla v case-control studii objevena statisticky významná asociace pro polymorfismus rs556171172 s rezistencí/vnímavostí k boviní tuberkulóze (Bhaladhare et al. 2016). Boviní tuberkulóza je způsobena bakterií *Mycobacterium bovis* a jak již bylo zmíněno

v literární rešerši, tak tento patogen způsobuje i zánět mléčné žlázy u skotu. Tento fakt zvyšuje důležitost genu *TLR2* a jeho polymorfismu v boji proti bakteriálním patogenům.

Fisher et al. (2011) poukazuje na potenciální recesivní genetickou asociaci polymorfismu rs43706433 s infekcí paratuberkulózy skotu (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - MAP). Tento fakt potvrzuje i studie O. Ruiz-Larrañaga et al. (2011), která informuje o výskytu tohoto polymorfismu v haplotypu, který je spojený s MAP infekcí.

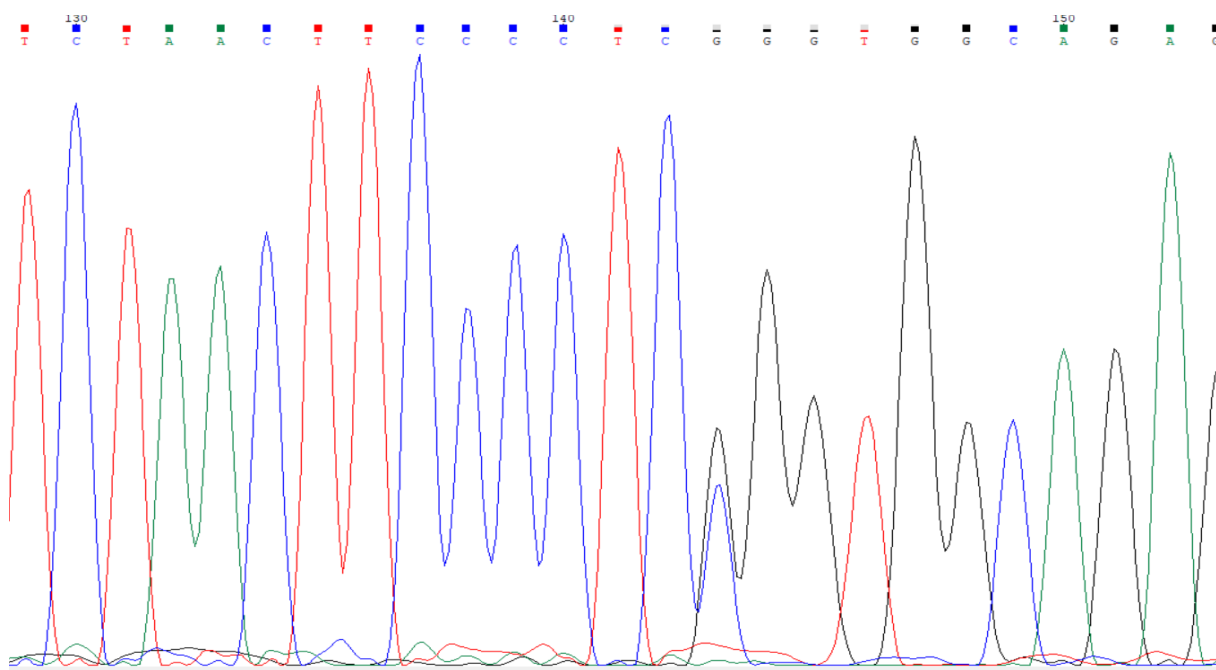
Studie Zhang et al. (2009) zkoumala mutace T385G, G398A a G188A v kódující oblasti genu *TLR2*, která kóduje extracelulární doménu receptoru. Metodou PCR-SSCP bylo genotypováno 240 zvířat ze tří plemen skotu (Holštýnské, Simentálské a Sanhe). Analýza odhalila statisticky významnou asociaci mezi mutací T385G a SCS. Průměr genotypu GG byl významně nižší, než průměr genotypu TT.

Studie Bai et al. (2022) informuje o významnosti exprese u genu *TLR2*. Výsledky ukázaly, že gen *TLR2* může podporovat apoptózu v epiteliálních buňkách mléčné žlázy a vaskulárních endoteliálních buňkách prostřednictvím upregulace exprese kaspázového proteinu a inhibici angiogeneze ve epiteliálních buňkách mléčné žlázy a vaskulárních endoteliálních buňkách prostřednictvím downregulace TEK receptorové tyrosinkinázy 2 u dojnic s klinickou mastitidou.

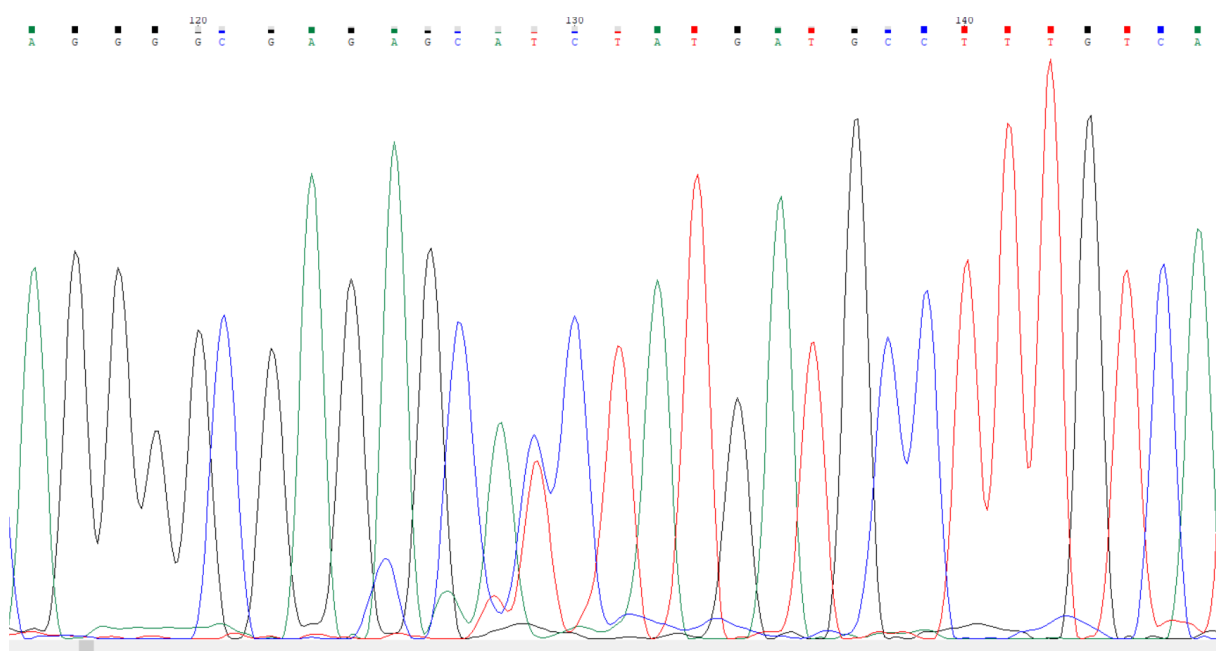
Mastitida je jedním z klíčových onemocnění v mlékárenském průmyslu a TLR receptory zde hrají dle literárních zdrojů a námi zjištěných výsledků velmi důležitou roli. Bylo zjištěno, že funkční polymorfismy v genu *TLR2* modifikují imunitní reakci u skotu a ovlivňují tak zdravotní a reprodukční vlastnosti. Je zřejmé, že TLR receptory mohou pomoci vyvinout strategie pro snížení ekonomických ztrát. V budoucnu by mohlo být užitečné zapojit tyto polymorfismy do šlechtitelských strategií pro snížení náchylnosti k infekčním onemocněním.

## **5.8 Návrh a optimalizace metody HRM pro polymorfismy rs29017188 a rs8193069 v genu *TLR4***

Návrh a optimalizace metody HRM pro detekci polymorfismů v genu *TLR4* byly úspěšné. Pomocí Sangerova sekvenování byly objeveny všechny varianty genotypů pro polymorfismy rs29017188 a rs8193069 u 96 dojnic Českého strakatého skotu (Obrázek 27 a 28). Vybraná zvířata posloužila jako standardy pro vývoj metodiky optimalizace HRM metody.

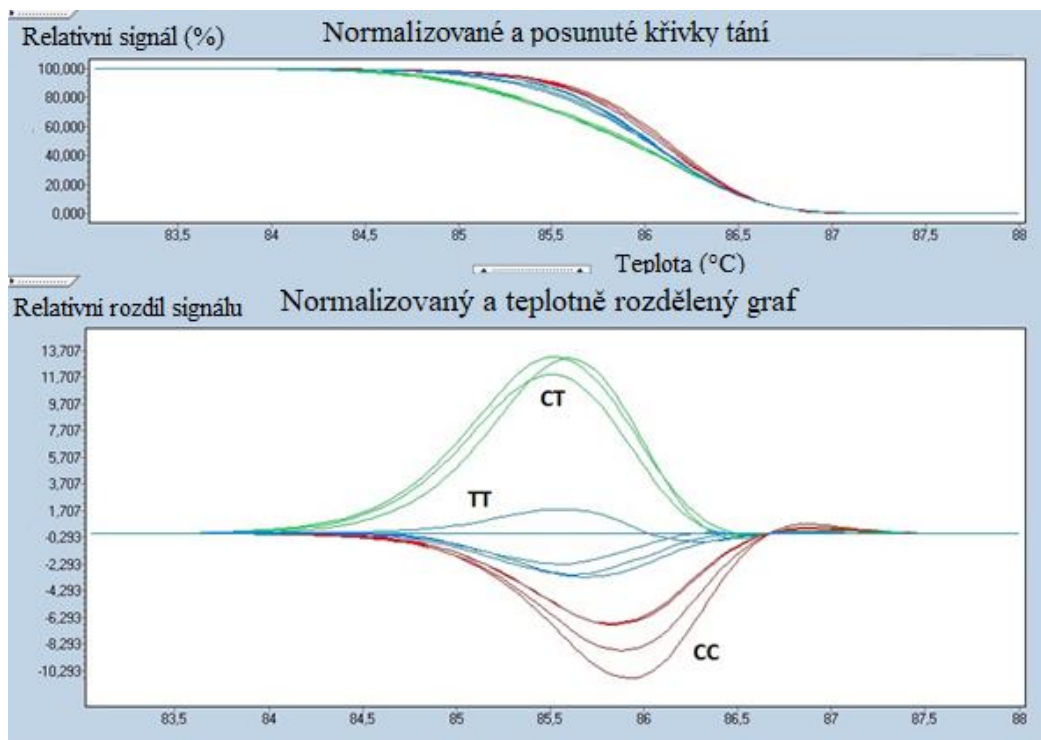


Obrázek 27 – Heterozygotní genotyp GC polymorfismu rs29017188 stanovený metodou Sangerovo sekvenování



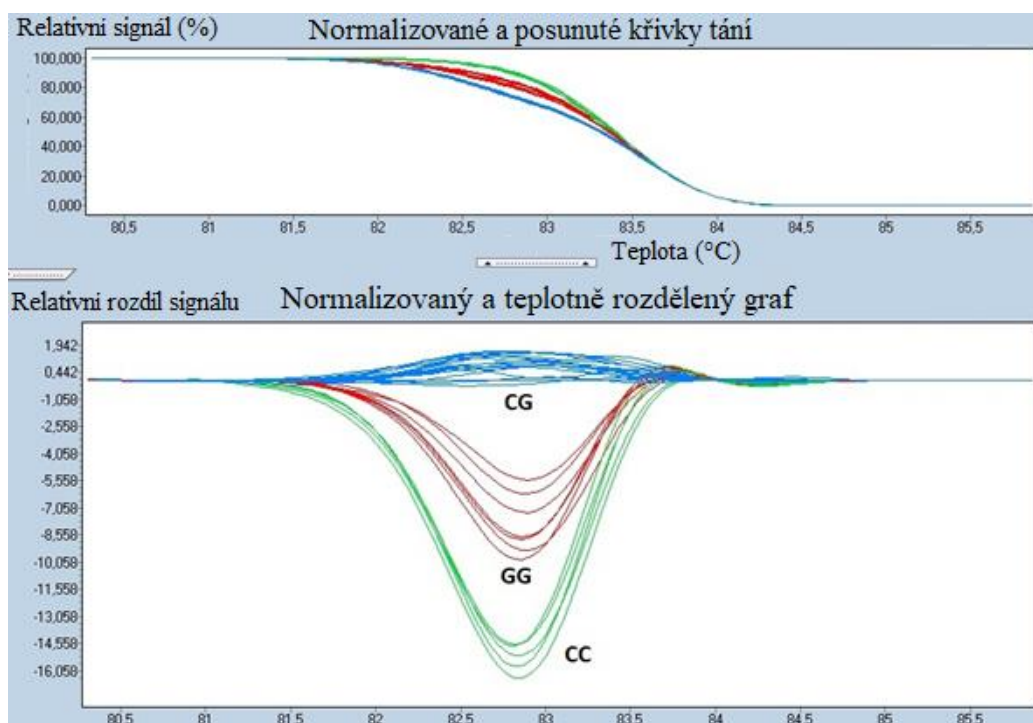
Obrázek 28 – Heterozygotní genotyp CT polymorfismu rs8193069 stanovený metodou Sangerovo sekvenování

Navržené primery umožnily amplifikaci fragmentů bez vedlejších produktů. Optimální teplota pro nasednutí primerů byla stanovena teplota 60 °C kdy docházelo k amplifikaci čistého produktu. Klíčovým aspektem bylo přesné ředění vstupní DNA, kdy stejné koncentrace umožnily vstup fragmentů do analýzy HRM se stejnými podmínkami. Z výsledků modulu Gene Scanning v Softwaru LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Německo) bylo možné rozdělit křivky příslušných genotypů do 3 skupin a zaznamenat tak genotyp jednotlivých zvířat, dle rozdělení na PCR destičce.



Obrázek 29 – Optimalizovaný postup pro stanovení genotypu polymorfismu rs29017188





Obrázek 30 – Optimalizovaný postup pro stanovení genotypu polymorfismu rs8193069

Polymorfismus rs29017188 je dán nukleotidovou záměnou G/C a nachází se v promotoru genu TLR4. O tomto polymorfismu není doposud známa žádná významná asociace. Polymorfismus rs8193069 způsobuje nukleotidovou záměnu C/T, které vede v případě c2021C>T k aminokyselinové záměně pThr674Ile, která se nachází v transmembránově-cytoplazmatické doméně (Mariotti et al. 2009). O významu polymorfismu u dojeného skotu rs8193069 informuje studie Chen et al. (2022) na holštýnském plemeni. Výsledky ukazují vztah tohoto polymorfismu s rezistencí na mastitidu a užitkovostí. Dojnice nesoucí genotyp CC mají statisticky významně nižší SCC a obsah tuhu v mléce. Tyto dojnice také dosahují vyšší 305denní a celkový nádoj mléka. Toto zjištění je potvrzeno studiemi (Beecher et al. 2010, Peng et al. 2010, Sharma et al. 2015).

Vyvinutá technologie může sloužit pro budoucí rutinní genotypování polymorfismů rs29017188 a rs8193069 a navazující asoiační studie.

## 5.9 Stanovení původců mastitid v mléce dojnic ČESTR na experimentální farmě Netluky

Pro sledování původců mastitidy na farmě Netluky bylo provedeno 1120 analýz vzorků, přičemž každý vzorek izolované DNA, byl podroben čtyřem qPCR reakcím pro příslušné multiplexy. Během screeningu bylo prověřeno 280 vzorků mléka. Nejčastěji byla zachycena bakterie *Corynebacterium bovis* s 92 výskyty. Z celkového počtu všech odebraných vzorků bylo 32,86 % s pozitivním nálezem DNA této bakterie.

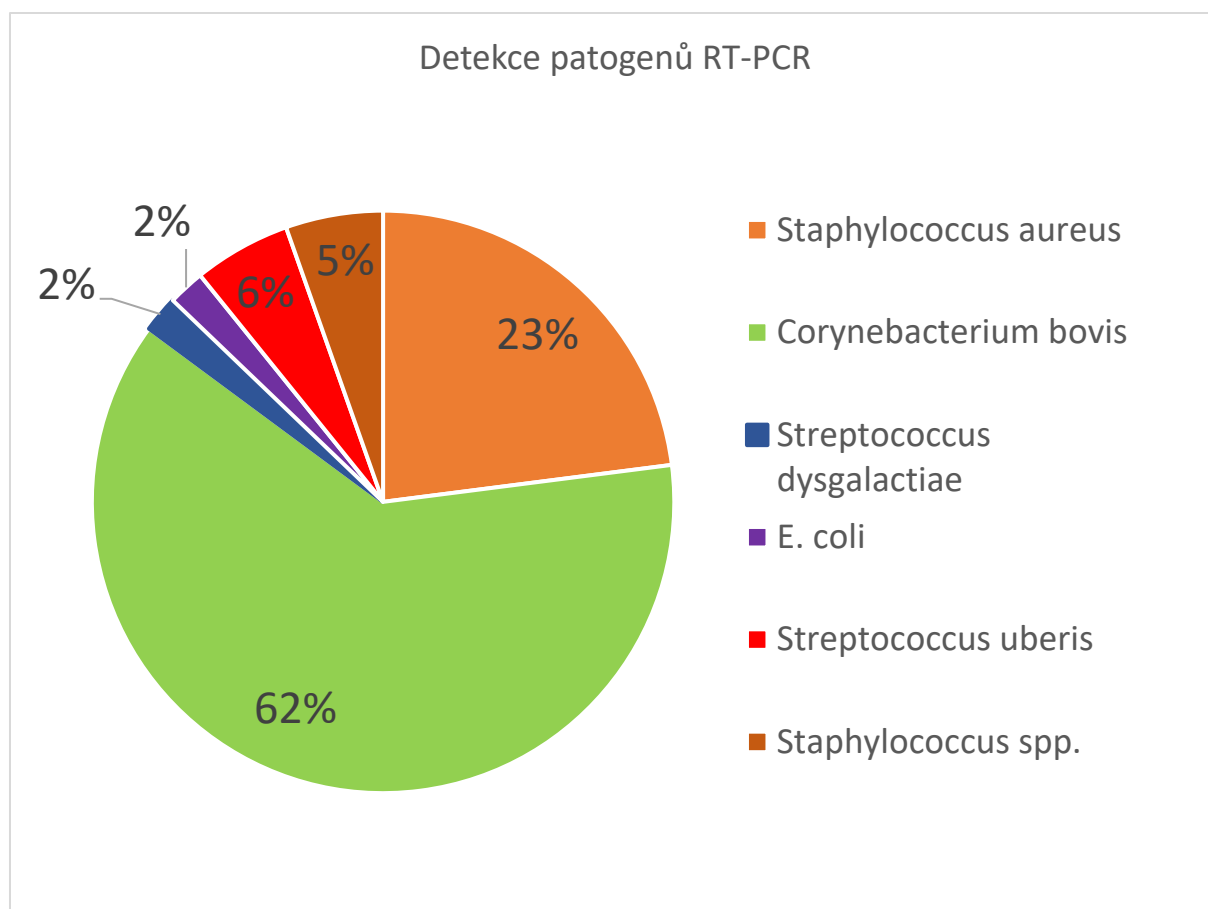
Druhou nejčastější nalezenou bakterií byl *Staphylococcus aureus*, který byl nalezen ve 34 vzorcích mléka. Také další druhy *Staphylococcus spp.* byly nalezeny v 8 vzorcích mléka a současně, na základě primerů určených k detekci stafylokokového beta-laktamanázového genu, byl tento penicilin-rezistentní gen nalezen u 32 stafylokokově pozitivní vzorků.

Další početnou skupinou byl rod Streptokoků, kdy *Streptococcus uberis* byl ve vzorcích zachycen 8krát a *Streptococcus dysgalactiae* třikrát. Posledním zachyceným patogenem byla enviromentální bakterie *E. coli*, která byla ve vzorcích zachycena třikrát (Tabulka 10).

Přítomnost DNA patogenů *Mycoplasma bovis*, *Enterococcus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Prototheca spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Trueperella pyogenes*, *Peptoniphilus indolicus*, Kvasinky, *Serratia marcescens* nebyla ve vzorcích čerstvého mléka detekována.

Tabulka 10 – Výskyt původců mastitid v chovu Českého strakatého skotu

<i>Staphylococcus aureus</i>	34
<i>Corynebacterium bovis</i>	92
<i>Mycoplasma bovis</i>	0
<i>Enterococcus spp.</i>	0
<i>Staphylococcal</i> $\beta$ -lactamase gene	32
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3
<i>Mycoplasma spp.</i>	0
<i>E. coli</i>	3
<i>Prototheca spp.</i>	0
<i>Streptococcus uberis</i>	8
<i>Staphylococcus spp.</i>	8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> a/nebo <i>K. pneumoniae</i>	0
<i>Trueperella pyogenes</i> a/nebo <i>Peptoniphilus indolicus</i>	0
Kvasinky	0
<i>Serratia marcescens</i>	0



Obrázek 31 – Procentuální zastoupení nalezených patogenů

Situaci ve světě popisují studie Levison et al. (2016) a Song et al. (2020). Výzkum Song et al. (2020) který byl proveden na 15 farmách v Číně, odhalil 1 020 přítomností patogenů v 1 153 vzorcích mléka z částí vemene, u kterých byla pozorována klinická mastitida. U 24,20 % vyšla kultura negativní. Nejčastějšími původci byli nalezeni *Staphylococcus* spp. (450) zahrnující koaguláza-negativní stafylokoky (322) a *S. aureus* (128), *Streptococcus* spp. (127), *Bacillus* spp. (95), *Corynebacterium* spp. (28).

Během studie Levison et al. (2016) bylo na Kanadských farmách odebráno 936 vzorků z části vemene, u kterého byla zjištěna klinická mastitida od 743 dojnic. U 22,4 % kultivovaných vzorků nebyl zjištěn žádný růst. Nejčastěji izolovanými patogeny klinických mastitid byly koaguláza-negativní stafylokoky (185), dále *Bacillus* spp. (152), *Streptococcus* spp. (97), *Staphylococcus aureus* (85), *Escherichia coli* (78), *Enterococcus* spp. (33), *Corynebacterium* spp. (32).

Výsledky nalezené na Čínských a Kanadských farmách jsou v kontrastu s našimi výsledky, kde převládala v chovu bakterie *Corynebacterium bovis* v 62 %. Oproti tomu ve zmiňovaných studiích převládaly Stafylokokové mastitidy mezi 30-40 %. U těchto studií byly také velmi často nalezeni méně obvyklí původci mastitidy, které v naší studii nebyli objeveni. V případě Kanadské studie byly nalezeny bakterie – *Enterococcus* spp. (33), *Klebsiella* spp. (18), *Enterobacter* spp. (28), *Trueperella pyogenes* (19), *Serratia* spp. (12) a kvasinková mastitida (14). Výsledky však nelze porovnávat globálně, jelikož v našem případě se jedná pouze o screening v jednom chovu na omezeném počtu zvířat. Naše studie charakterizuje pouze konkrétní farmu, která je charakterizována určitým prostředím.

Výzkum Bzdil et al. (2011) monitoruje výskyt mastitidy mezi lety 2000–2010 v 41 regionech České republiky. Výsledky výzkumu uvádí *Streptococcus uberis* (22,09 %) jako nejčastější patogen. Dále byly monitorovány nejčastěji bakterie *Staphylococcus aureus* (16,41 %), *Escherichia coli* (7,01 %), *Streptococcus agalactiae* (5,09 %) a *Streptococcus dysgalactiae* (5,09 %).

Studie Cervinkova et al. (2014) analyzovala 669 vzorků kravského mléka od asymptomatických krav z 16 mléčných farem. Tyto vzorky byly kultivací a PCR reakcí vyšetřeny na přítomnost mikroorganismů s potenciálem způsobovat mastitidu. Nejčastěji byly pozorovány koaguláza-negativní stafylokoky (53,5 %), *Streptococcus* spp. (16,1 %),

*Enterococcus* spp. (16,1%), *Escherichia coli* (6,6 %) a kvasinková mastitida (8,2 %). Tato studie také informuje o přítomnosti  $\beta$ -lactamanázového genu u 61,5% nálezů patogenu *Staphylococcus aureus*, který je zodpovědný za resistenci proti penicilinu. V naší studii byl  $\beta$ -lactamanázový gen identifikován u 94,12 % případů *S. aureus*.

Výzkum Pyatov et al. (2017) se zaměřil na vývoj multiplexových reakcí pro detekci genů resistance u bakteriálních původců mastitidy. Pro detekci bylo použito 249 izolátů, z nichž 111 bylo pozitivních na *E. coli*, 52 na *S. aureus*, 86 na *Streptococcus* spp. Většina (60,2 %) bakterií nesla alespoň jeden gen antibiotické resistance a 44,6 % bylo multirezistentních.

## 6. Závěr a doporučení pro praxi a výzkum

Zánět mléčné žlázy a další onemocnění skotu způsobují značné ekonomické ztráty v mlékárenském průmyslu. Detekce těchto onemocnění často bývá velmi obtížná, zvláště v případě subklinické mastitidy, kdy nemusí být pozorované žádné příznaky. V současné době je také velkým problémem léčba těchto onemocnění, kdy dochází k nárůstu kmenů bakterií s rezistencí na antibiotickou léčbou. Důležitou strategií pro prevenci v boji s infekčními onemocněními by mohly být, současně s přísnými zootechnickými a hygienickými postupy, dlouhodobé šlechtitelské strategie za pomoci markerů méně náchylných k mastitidám a dalším nemocem. Cílem práce bylo analyzování genetických markerů z oblasti imunitního systému skotu a odhad jejich vlivu na ukazatele zdraví nebo plodnosti a studium variability kódující oblasti genů signální dráhy TLR receptorů u vybrané populace dojnic českého strakatého skotu.

V disertační práci byl v genu *IRAK1* identifikován jako potenciální genetický marker polymorfismus rs110533802, kdy přítomnost mutované alela *T* negativně ovlivňuje skóre somatických buněk na první ( $p = 0,0436$ ) a druhé ( $p = 0,0135$ ) laktaci a také ovlivňuje řadu exteriérových znaků lineárního popisu: hloubka vemene ( $p = 0,0001$ ), celkové hodnocení vemene ( $p = 0,0202$ ), (kondice =  $p = 0,0047$ ), hranatost ( $p = 0,0450$ ), rámeček ( $p = 0,0134$ ) a úhel paznehtu ( $p = 0,0283$ ). V genu *TLR2* byly nalezeny 3 potenciální genetické markery pro rezistenci vůči mastitidě. Souhrnný genotyp *SHTLR1* (rs68268260, rs68268250, rs68268263, rs68268256, rs68343167 a rs68343168) v heterozygotních genotypěch vykazuje statisticky významně nižší výskyt mastitidy na první a druhé laktaci oproti původním homozygotním genotypům. Souhrnný genotyp *SHTLR2* (rs55617172 a rs43706433) vykazuje statisticky významně vyšší výskyt mastitidy na první a druhé laktaci pro mutované homozygotní genotypy. Pro původní homozygotní genotyp *CC* polymorfismu rs43706434 byl nalezen statisticky významný rozdíl ve výskytu mastitidy na první a druhé laktaci oproti ostatním genotypům.

Disertační práce vycházela z vědeckých hypotéz:

- 1) Hodnoty zdravotních znaků sledované přímo v chovech skotu, jako je např. obsah somatických buněk, výskyt mastitid a onemocnění paznehtů, jsou vedle faktorů vnějšího prostředí ovlivněny především genetickým založením jedince.

2) Proměnlivost a efektivnost imunitní odpovědi na patogenní vlivy a odolnost zvířete přímo souvisí s polymorfismem vybraných genů imunitního systému.

Stanovené vědecké hypotézy nelze vyvrátit na základě zjištěných výsledků v genech *IRAK1* a *TLR2*, kdy se genetické polymorfismy v těchto genech jeví jako potenciálně významné genetické markery pro rezistenci vůči zánětu mléčné žlázy.

Disertační práce také přináší perspektivu do budoucího výzkumu. Molekulární metody navržené a ověřené pro screening variability těchto genů (*TLR2*, *TLR4* a *IRAK1*) u Českého strakatého skotu mohou sloužit jako osvědčený metodický postup pro další výzkum těchto genů u jiných plemen a stád. Relativně nízká genová diverzita nalezená v populaci ČESTR ostře kontrastuje s vysokou diverzitou registrovanou v European Variation Archive. Zkoumání nalezených variancí může být také užitečné pro následné asociační studie a šlechtění na zdravotní znaky a odolnost vůči patogenům. I když varianty nebyly předpovězeny jako kauzální mutace ovlivňující imunitu a zdraví, mohou působit jako genetické markery, pokud jsou v absolutní vazbě s mutacemi, které mají výraznější účinek jako se ukázalo u polymorfismu rs110533802 v genu *IRAK1*. Studie přináší nové poznatky o variabilitě genů nativní imunity, které mohou ovlivnit odolnost a užitkovost skotu. Výzkum této povahy může pomoci při vývoji vylepšené metody pro návrh DNA čipů. V současné době se polymorfismy v genu *TLR2* nenachází na komerčních DNA čipech. Implikování dalších potenciálních genetických markerů do DNA čipů by mohla být prvním krokem k umožnění úpravy šlechtitelských strategií pro rezistenci vůči bakteriálním onemocněním. Spolupráce mezi výzkumnými a chovatelskými organizacemi může být klíčová pro rozvoj strategie pro prevenci infekčních chorob v chovech skotu.

## Reference

- Abed RM. 2009. Nucleic acid-based techniques for studying diversity and activity of bacterial communities in oil-contaminated sediments. *Contaminated Sediments* 97-160.
- Abou-Elmagd S, Kotb H, Abdalla K, Refai M. 2011. Prevalence of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in animals from Quena Governorate with special reference to RAPD-PCR patterns. *Journal of American Science* 7:20-31.
- Adkins NL, Georgel PT. 2011. MeCP2: structure and function. *Biochemistry and Cell Biology* 89:1-11.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801
- Almeida RA, Luther DA, Patel D, Oliver SP. 2011. Predicted antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 148:323-328.
- Badami S, Thanislass J, Barathiraja S. 2019. Identification of single nucleotide variations in the Toll-like receptor 9 (TLR9) gene and its association to mastitis susceptibility in dairy cattle. *Biological Rhythm Reserch* 50:887-896.
- Bagnicka E, Kawecka-Grochocka E, Pawlina-Tyszko K, Zalewska M, Kapusta A, Kościuczuk E, Marczak S, Ząbek T. 2021. MicroRNA expression profile in bovine mammary gland parenchyma infected by coagulase-positive or coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Research* 52:1-20.
- Bai X, Wang X, Lin T, Dong W, Gao Y, Ji P, ... Zhang Q. 2022. Toll-like receptor 2 is associated with the immune response, apoptosis, and angiogenesis in the mammary glands of dairy cows with clinical mastitis. *International Journal of Molecular Sciences* 23:10717.
- Baralle FE, Giudice J. 2017. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18:437-451.
- Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiau B, Mainil JG. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm



formation, intracellular survival, capsular profile, and agr-typing. *Veterinary Microbiology* **185**:1-6.

Beecher C, Daly M, Childs S, Berry D, Magee D, McCarthy T, Giblin L. 2010. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC Genetics* **11**:1-9.

Bhaladhare A, Sharma D, Kumar A, Sonwane A, Chauhan A, Singh R, Kumar P, Yadav R, Baqir M, Bhushan B, Prakash O. 2016. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Veterinary World* **9**:458-464.

Bhaladhare A, Sharma D, Kumar A, Sonwane A, Chauhan A, Singh R, Kumar P, Yadav R, Baqir M, Bhushan B, Prakash O. 2016. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Veterinary World* **9**:458-464.

Bhavaniramya S, Vanajothi R, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Computational characterization of deleterious SNPs in TOLL-like receptor gene that potentially cause mastitis in dairy cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **19**.

Bhavaniramya S, Vanajothi R, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Computational characterization of deleterious SNPs in Toll-like receptor gene that potentially cause mastitis in dairy cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **19**:101151.

Bilgen N, Kul CK, Offord V, Werling D, Ertugrul O. 2016. Determination of Genetic Variations of Toll-like receptor (TLR) 2, 4, and 6 with Next-Generation Sequencing in Native Cattle Breeds of Anatolia and Holstein Friesian. *Diversity* **8**:1-13.

Bjelka M, Novák K. 2020. Association of TLR gene variants in a Czech Red Pied cattle population with reproductive traits. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **220**:109997.

Blagitz MG, Souza FN, Santos BP, Batista CF, Parra AC, Azevedo LFF, Melville PA, Benites NR, Della Libera AMMP. 2013. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. *Journal of Dairy Science* **96**:3750-3757.

Boichard D, Ducrocq V, Croiseau P, Fritz S. 2016. Genomic selection in domestic animals: principles, applications, and perspectives. *Comptes Rendus Biologies* **339**:274-277.

Bonsaglia ECR, Rossi RS, Latosinski G, Rossi BF, Campos FC, Junior AF, Pantoja JCF, Rall VLM. 2023. Relationship between Biofilm Production and High Somatic Cell Count in *Streptococcus agalactiae* Isolated from Milk of Cows with Subclinical Mastitis. *Pathogens* **12**:311.

Botos I, Segal DM, Davies DR. 2011. The structural biology of Toll-like receptor. *Structure* **19**:447-459.

Bowie A & O'Neill LAJ. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* **67**:509-514.

Bozzo G, Bonerba E, Di Pinto A, Bolzoni G, Ceci E, Mottola A, Tantillo G, Terio V. 2014. Occurrence of *Prototheca* spp. in cow milk samples. *New Microbiola* **37**:459-464.

Brzezińska-Blaszczyk E & Wierzbicki M. 2010. Mast cell toll-like receptors (TLRs). *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* **64**:11–21.

Bucek P, Kučera J, Syrůček J, Lipovský D. 2020. Ročenka – Chov skotu v České republice. Českomoravská společnost chovatelů. Hradištko.

Bytyqi H, Zaugg U, Sherifi K, Hamidi A, Gjonbalaj M, Muji S, Mehmeti H. 2010. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. *Veterinarski Archiv* **80**:173-183.

Bzdil J. 2011. Prevalence of selected pathogens of mammary gland in cattle during the years 2000 to 2010. *Veterinarstvi* **61**:7-11.

Capparelli R, De Chiara F, Nocerino N, Medaglia Ch, Di Constanzo R, Ramunno L, Capuano F, Casalnuovo F, Di Matteo A, Iannellia D. 2013. Heterozygosity at the A625C Polymorphic Site of the MyD88 gene Is Associated with *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Infection and immunity* **81**: 2139-2144.

Cargill EJ, Womack JE. 2007. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics* **89**: 745-755.

Carrasco-Colom J, Jordan I, Alsina L, Garcia-Garcia J, Cambra-Lasaosa FJ, Martín-Mateos MA, Juan M, Muñoz-Almagro C. 2015. Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88,

and Severe Invasive Pneumococcal Disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **34**:1008-1013.

Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology* **7**:1074-1081.

Cell Signaling technology. 2022. Immunology: how does the innate immune system work. Available from <https://blog.cellsignal.com/immunology-how-does-the-innate-immune-system-work> (accessed May 2022).

Cervinkova D, Vlkova H, Borodacova I, Makovcova J, Babak V, Lorencova A, Vrtkova I, Marosevic D, Jaglic Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinarni Medicina* **58**:567-575.

Cole JB, Wiggans GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ, Crooker BA, Van Tassel CP, Yang J, Wang S, Matukumalli LK, Da Y. 2011. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary US Holstein cows. *BMC Genomics* **12**:1-17.

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and toll-like receptor 2. *Journal of Virology* **77**:4588–4596.

Crawshaw WM, MacDonald NR, Duncan G. 2005. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Veterinary Record* **156**:812-813.

ČESTR. 2022. Český strakatý skot. Available from <https://www.cestr.cz/cs/plemeno/cesky-strakaty-skot> (accessed May 2022).

Davidson DJ, Currie AJ, Bowdish, DME, Brown KL, Rosenberger CM, Ma RC, Bylund J, Campsall PA, Puel A, Picard C, Casanova JL, Turvey SE, Hancock REW, Devon RS, Speert DP. 2006. IRAK-4 mutation (Q293X): Rapid detection and characterization of defective post-transcriptional TLR/IL-1R responses in human myeloid and non-myeloid cells. *Journal of Immunology* **177**:8202-8211.

Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzales D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon M. 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* **6**:53.

Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma AK, Tiwari R, Dhama K, Singh U, Kumar S. 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **16**:1653-1661.

Dudek K, Bednarek D, Ayling RD, Szacawa E. 2013. Immunomodulatory effect of *Mycoplasma bovis* in experimentally infected calves. *Journal of Veterinary Research* **57**:499-506.

Dufva M. 2009. Introduction to Microarray Technology. *DNA Microarrays for Biomedical Research. Methods in Molecular Biology*, vol 529. Humana Press.

Eberlein A, Kalbe C, Goldammer T, Brunner RM, Kuehn C, Weikard R. 2011. Annotation of novel transcripts putatively relevant for bovine fat Metabolism. *Molecular Biology Reports* **38**:2975–2986.

Elmaghraby MM, El-Nahas AF, Fathala MM, Sahwan FM, Taq EL-Dien MA. 2018. Association of toll-like receptor 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle. *Iranian Journal of Veterinary Research* **19**:202-207.

El-Shafaey E, Ateya A, Ramadan H, Saleh R, Elseady Y, Abo El Fadl E, El-Khodery S. 2017. Single Nucleotide Polymorphism in IL8 and TLR4 Genes as Candidates for Digital Dermatitis Resistance/Susceptibility in Holstein Cattle. *Animal Biotechnology* **28**:131-137.

Feßler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. 2010. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65**:1576-1582.

Fisher CA, Bhattarai EK, Osterstock JB, Dowd SE, Seabury PM, Vikram M, Whitlock RH, Schukken YH, Schnabel RD, Taylor JF, Womack JE, Seabury CM. 2012. Evolution of the Bovine TLR Gene Family and Member Associations with *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Infection. *PLOS ONE* **7**.

Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T. 2001. Differential expression of toll-like receptor 2 in human cells. *Journal Leukocyte Biology* **69**:474–481.

Friman MJ, Eklund MH, Pitkälä AH, Rajala-Schultz PJ, Rantala MHJ. 2019. Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica* **61**:1-11.

Fu Y, Liu B, Feng X, Liu Z, Liang D, Li F, Li D, Cao Y, Feng S, Zhang X, Zhang N, Yang Z. 2013. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **151**:20–27.

Gao Y, Jiang J, Yang S, Cao J, Han B, Wang Y, Zhang Y, Yu Y, Zhang S, Zhang Q, Fang L, Cantrell B, Sun D. 2018. Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics* **19**:972.

GeneCards <sup>®</sup>. 2022. GeneCards <sup>®</sup>: The Human Gene Database. Available from <https://www.genecards.org/> (accessed May 2022).

Georges M, Charlier C, Hayes B. 2019. Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nature Reviews Genetics* **20**:135-156.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. 1996. A Novel Method for Real-Time Quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**:995–1001.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. 1996. A Novel Method for Real-Time Quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**:995–1001.

Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ, Budowle B. 1994. Forensic Application of DNA 'Fingerprinting'. *Nature* **352**:427–429.

Goldammer T, Zerbe H, Molennar A, Schuberth J, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of A-Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol* **11**:174-185.

González-Recio O. 2012. Epigenetics: a new challenge in the post-genomic era of livestock. *Frontiers in Genetics* **2**:106.

Gröhn YT, Wilson DJ, González RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, Schukken YH. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**:3358-3374.

Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* **49**:396-406.

Harmon RJ. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* **77**:2103-2112.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science* **92**:433-443.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real-Time Quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986–994.

Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, et al. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry* **52**:494-503.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1993. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* **11**:1026–1030.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1992. Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology* **11**:1026–1030.

Hillerton JE, Berry EA. 2003. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **19**:157-169.

Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the toll signaling pathway. *Nature Immunology* **2**: 835–841.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *Journal Immunology* **162**:3749–3752.

Hosseini AM, Majidi J, Baradaran B, Yousefi M. 2015. „Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases“. In: *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **5**: 605- 614.

Hosseini N, Tahoori MT, Mohammadzadeh A, Jaliani HZ, Sani MB, Salehabadi HS. 2020. IRAK1 Gene Polymorphism in Rheumatoid Arthritis. *A journal of Molecular and Cellular Immunology* **50**:304-321.

- Hultgren OH, Svensson L, Tarkowski A. 2002. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology* **168**:5207–5212.
- Chen H, Liu C, Xiang M, Yu J, Xia Y, Hu X, Wang D, Tao B, Zhang Y, Cheng L. 2022. Contribution of the mutation rs8193069 in TLR4 to mastitis resistance and performance in Holstein cows in southern China. *Veterinary Medicine and Science* **8**:357–366.
- Chen ZJ. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature Cell Biology* **7**:758-765.
- Cheng J, Zhang J, Han B, Barkema HW, Cobo ER, Kastelic JP, Zhou M, Shi Y, Wang J, Yang R, Gao J. 2020. *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis is cytopathogenic for bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* **103**:3493–3504.
- Illumina. 2019. Infinium HTS Assay Reference Guide. Illumina. San Diego, USA.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860–921.
- Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. 2003. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)- mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB 2-PKR. *Journal of Biological Chemistry* **278**:16713–16719.
- Jones P. 2012. *DNA Sequencing: Methods and Applications*. Humana Press. New York.
- Jost BH, Billington SJ. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**:87–102.
- Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. 2009. Recognition of lipopeptide patterns by toll-like receptor 2-toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* **31**:873–884.
- Kawai T & Akira S. 2007. TLR signaling. *Seminars in immunology* **19**:24–32.

Keefe G. 2012. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **28**:203-216.

Kim HJ, Youn HY, Kang HJ, Moon JS, Jang YS, Song KY, Seo KH. 2022. Prevalence and virulence characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in bovine mastitis milk compared to bovine normal raw milk in South Korea. *Animals* **12**:1407.

Komatsu T, Yoshida E, Shigenaga A, Yasuie N, Uchiyama S, Takamura Y, Sugie K, Kimura K, Haritani M, Shibahara T. 2021. Fatal suppurative meningoencephalitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in two calves. *Journal of Veterinary Medical Science* **83**:1113–1119.

Krömker V, Reinecke F, Paduch JH, Grabowski N. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clinical Microbiology: Open Access* **3**.

Kucinskas L, Bruzaite A, Cepaite J, Kucinskiene V, Ugenskiene R, Valiukeviciene S. 2020. IRAK1 gene SNPs rs1059703 and rs3027898 polymorphisms are associated with psoriasis. *European Journal of Human Genetics* **28**:240.

Kurumisawa T, Kano R, Nakamura Y, Hibana M, Ito T, Kamata H, Suzuki K. 2018. Is bovine protothecal mastitis related to persistent infection in intestine?. *Journal of Veterinary Medical Science* **80**:950-952.

Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ. 1994. Effects of Primer-Template Mismatches on the Polymerase Chain Reaction: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Model Studies. *Nucleic Acids Research* **22**:5059–5067.

Leong IUS, Skinner JR, Love DR. 2014. Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Medical Sciences* **2**:98-126.

Levison LJ, Miller-Cushon EK, Tucker AL, Bergeron R, Leslie KE, Barkema HW, DeVries TJ. 2016. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science* **99**:1341-1350.

Li J, Ebata A, Dong Y, Rizki G, Iwata T, Lee SS. 2008. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLOS Biology* **6**:33.



Lin KM, Hu W, Troutman TD, Jennings M, Brewer T, Li X, Nanda S, Cohen P, Thomas JA, Pasare C. 2014. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:775-780.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* **4**:357–362

Luan T, Woolliams JA, Lien S, Kent M, Svendsen M, Meuwissen THE. 2009. The Accuracy of Genomic Selection in Norwegian Red Cattle Assessed by Cross-Validation. *Genetics* **183**:1119–1126.

Massé J, Dufour S, Archambault M. 2020. Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **103**:3392–3400.

Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED. 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**:772-783.

Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JCG, Salkowski C, Thang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. 2003. Distinct Mutations in IRAK4 Confer Hyporesponsiveness to Lipopolysaccharide and Interleukin-1 in Patient with Recurrent Bacterial Infections. *The Journal of Experimental Medicine* **198**:521-531.

Meuwissen T, Hayes BJ, Goddard ME. 2001. Prediction of total genetic value using genomewide dense marker maps. *Genetics* **157**:1819-1829.

Meuwissen T, Hayes BJ, Goddard ME. 2016. Genomic selection: A paradigm shift in animal breeding. *Animal Frontiers* **6**: 6-14.

Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. 2011. Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations. *Nucleic Acids Research* **39**:37.

Montgomery J, Wittwer CT, Palais R. 2007. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols* **2**:59-66.

Mullis KB. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* **262**:56–65.

- Narayanan S, Nagaraja TG, Wallace N, Staats J, Chengappa MM, Oberst RD. 1998. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. *American Journal Veterinary Research* **59**:271–276.
- Nicholas RAJ, Ayling RD. 2003. *Mycoplasma bovis*: Disease, Diagnosis, and Control. *Research in Veterinary Science* **74**:105-112.
- Nishiya T, Kajita E, Horinouchi T, Nishimoto A, Miwa S. 2007. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Letters* **581**:3223-3229.
- Norberg E. 2005. Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. *Livestock Production Science* **96**:129-139.
- Norman HD, Miller RH, Wright JR, Wiggans GR. 2000. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement. *Journal of Dairy Science* **83**:2782-2788.
- Novák K, Bjelka M, Samake K, Valčíková T. 2019. Potential of TLR-gene diversity in Czech indigenous cattle for resistance breeding as revealed by hybrid sequencing. *Archives Animal Breeding* **62**:477-490.
- Novák K, Czerneková V, Kyselová J, Bjelka M. 2018. Laboratorní určování funkčních variant v genech TLR přirozené imunity skotu. VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i. V UHŘÍNĚVSI. Česká republika. Certifikovaná metodika 978-80-7403-211-0.
- Novák K. 2014. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **157**:1–11.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal Immunology* **164**:558–561.
- Oliver SP & Calvinho FP. 1995. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. 2nd Intl. Workshop on Biology of Lactation in Farm Animals. *Journal Animal Science* **73**:18-33.
- Pandey S, Kawai T, Akira S. 2015. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* **7**.

- Parker DC. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology* **11**:331-360.
- Peng L, Jie B, Zhang X, Lixin T, Shenglin J, Wenrong L, Mingjun L. 2010. Association the mutation of 2021 locus of Toll-like receptor 4 gene (TLR4) exon III polymorphisms with somatic cell score in Xinjiang brown cattle. *Journal of Agricultural Biotechnology* **18**:1115-1122.
- Pereira UP, Oliveira DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LJ. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Veterinary Microbiology* **148**:117-124.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**:509–515.
- Prebavathy T, Thanislass J, Dhanammal L, Ganesan R, Mukhopadhyay HK. 2015. Association between SNPs in TLR2 gene segment corresponding to LRR functional domain of TLR2 receptor and bovine mastitis. *Asian Journal of Animal Sciences* **9**:45-56.
- Pyatov V, Vrtková I, Knoll A. 2017. Detection of selected antibiotic resistance genes using multiplex PCR assay in mastitis pathogens in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* **86**:167-174.
- Rakesh Ranjan RR, Swarup D, SD, Patra RC, Nandi D, ND. 2006. Bovine protothecal mastitis: a review. *CABI Reviews*:7.
- Riekerink RGMO, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE, Kelton DF. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **97**:20-28.
- Róžańska H, Lewtak-Piłat A, Kubajka M, Weiner M. 2019. Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Research* **63**:93.
- Ruegg PL, Guterbock WM, Holmberg CA, Gay JM, Weaver LD, Walton RW. 1992. Microbiologic investigation of an epizootic of mastitis caused by *Serratia marcescens* in a dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **200**:184–189.

Ruiz-Larrañaga O, Manzano C, Iriando M, Garrido JM, Molina E, Vazquez P, ... Estonba A. 2011. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* **94**:3635-3641.

Ruiz-Martinez MC, Berka J, Belenkii A, Foret F, Miller AW, Karger BL. 1993. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* **65**:2851-2858.

Russell CD, Widdison S, Leigh JA, Coffey TJ. 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle. *Veterinary Research* **43**.

Ryu WS. 2017. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Academic Press. Cambridge.

Saatchi M, Schnabel RD, Rolf MM, Taylor JF, Garrick DJ. 2012. Accuracy of direct genomic breeding values for nationally evaluated traits in US Limousin and Simmental beef cattle. *Genetics Selection Evolution* **44**:1-10.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**:487-491.

Seabury CM, Cargill EJ, Womack JE. 2007. Sequence variability and protein domain architecture for bovine Toll-like receptors 1, 5 and 10. *Genomics* **90**:502-515.

Seabury CM, Seabury PM, Decker JE, Schnabel RD, Taylor JF, Womack JE. 2010. Diversity and evolution of 11 innate immune genes in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:151-156.

Seligsohn D, Crestani C, Forde TL, Chenais E, Zadoks RN. 2021. Genomic analysis of group B *Streptococcus* from milk demonstrates the need for improved biosecurity: a cross-sectional study of pastoralist camels in Kenya. *BMC Microbiology* **21**:1-10.

Sharma BS, Abo- Ismail M, Schenkel F, You Q, Verschoor C, Pant S, Karrow N. 2015. Association of TLR4 polymorphisms with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Animal Genetics* **46**:560-565.

- Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA. 2006. Association of Toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* **89**:3626–3635.
- Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. 2011. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **24**:429–438.
- Shimizu T, Kawasaki Y, Aoki Y, Magata F, Kawashima C, Miyamoto A. 2017. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-like Receptor 4 (TLR4) on Reproductive Performance and Immune Function in Dairy Cows. *BIOCHEMICAL GENETICS* **55**:212-222.
- Shome BR, Bhuvana M, Mitra SD, Krithiga N, Shome R, Velu D, Banerjee A, Barbuddhe SB, Prabhudas K, Rahman H. 2012. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Tropical Animal Health and Production* **44**:1981-1992.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-470.
- Schroder K & Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**:821-832.
- Schukken YH et al. 2009. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **128**:60-70.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DGE, Quesnell R, Watts JL, Yancey RJ, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **144**:270-289.
- SINHA MK, THOMBARE NN, MONDAL B. 2014. Subclinical Mastitis in Dairy Animals: Incidence, Economics, and Predisposing Factors. *The ScientificWorld Journal* **4**.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**:674-679.
- Sobahi N, Han A. 2020. High-throughput and label-free multi-outlet cell counting using a single pair of impedance electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **166**:112458.
- Sompayrac L. 2019. *How the immune system works*. NJ: Wiley-Blackwell. Hoboken.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Journal Dairy Science*. **80**:1851–1865

Sperry JL, Zolin S, Zuckerbraun BS, Vodovotz Y, Namas R, Neal MD, Ferrel RE, Rosengart MR, Peitzman AB, Billiar TR. 2014. X chromosome-linked IRAK-1 polymorphism is a strong predictor of multiple organ failure and mortality postinjury. *Annals of Surgery* **260**:698-705.

Sun M, Gao X, Zhao K, Ma J, Yao H, Pan Z. 2021. Insight Into the Virulence Related Secretion Systems, Fimbriae, and Toxins in O2:K1 Escherichia coli Isolated From Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science* **8**:1-14.

SVAZ CHOATELŮ ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU. Chovný cíl a standard – Šlechtitelský program Českého strakatého skotu. 2012. Available at: <https://www.cestr.cz/cs/slechteni/slechtitelsky-program>

Syvänen AC. 2001. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation* **13**:1–10.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulos L, Flavell RA, Beutler B. 2004. Toll-like receptor 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:3516-3521.

Takeda K & Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology* **16**:3–9.

Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* **17**:1-14.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* **13**:933-940.

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology* **169**:10-14.

- Tong J, Zhang H, Zhang Y, Xiong B, Jiang L. 2019. Microbiome and Metabolome Analyses of Milk From Dairy Cows With Subclinical *Streptococcus agalactiae* Mastitis—Potential Biomarkers. *Frontiers in Microbiology* **10**:1-14.
- Turvey SE & Broide DH. 2010. Innate Immunity. *Journal Allergy Clinical Immunology* **125**:24-32.
- Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. 1996. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* **14**:303–308.
- Uniprot. 2007. UniProtKB – Q2LGB3 (IRAK1\_BOVIN). Available from <https://www.uniprot.org/uniprot/Q2LGB3>(accessed june 2022)
- Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K. 2013. Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks. In: *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics*. *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics*:3-11.
- Van Eenennaam AL. 2019. Application of genome editing in farm animals: Cattle. *Transgenic Research* **28**:93-100.
- Verma M, Kulshrestha S, Puri A. 2017. *Genome Sequencing. Bioinformatics. Methods in Molecular Biology* 1525. Humana Press, New York.
- Viale E, Tiezzi F, Maretto F, De Marchi M, Penasa M, Cassandro M. 2017. Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. *Journal of Dairy Science* **100**:7271-7281.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution* **34**: 275-305.
- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology* **27**:486-493.
- Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. 2003 TLRs: differential adapter utilization by Toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Molecular Interventions* **3**:466–77.

- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S. 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* **83**:2373-2379.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S, Tock C. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* **17**:804–807.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* **49**:853-860.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK. 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *Journal of immunology* **165**:7125-7132.
- Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. 2014. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Molecular Immunology* **58**:66-76.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E coli*, but *S aureus* fails to both activate NF-kappa B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF alpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology* **45**:1385–1397.
- Yang X, Dong N, Chan EW, Zhang R, Chen S. 2021. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology* **29**:65–83.
- Zammatteo N, Jeanmart L, Hamels S, Courtois S, Louette P, Hevesi L, Remacle J. 2000. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Analytical Biochemistry* **280**:143-150.
- Zhang H, Pu J, Wang X, Shen L, Zhao G, Zhuang C, Liu R. 2013. IRAK1 rs3027898 C/A polymorphism is associated with risk of rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* **33**: 369-375.



Zhang LP, Gan QF, Ma TH, Li HD, Wang XP, Li JY, Gao X, Chen JB, Ren HY, Xu SZ. 2009. Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCS in dairy cattle. *Animal Biotechnology* **20**:87-95.

Zhang Z, Li XP, Yang F, Luo JY, Wang XR, Liu LH, Li HS. 2016. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **99**:6484

Zhao PL, Li QH, Liang RN, He X. 2020. Interleukin-1 receptor-associated kinase gene polymorphisms contribute to rheumatoid arthritis risk: A meta-analysis. *International Journal of Rheumatic Diseases* **23**:1619-1626.

Zhou HT, Cheng L, Gong H, Byun SO, Edwards GR, Hickford JGH. 2017. Variation in the Toll-like Receptor 4 (TLR4) gene affects milk traits in dairy cows. *Journal of Dairy Research* **84**:426-429.

Zhu J & Mohan Ch. 2010. Toll-like receptor signaling pathway –therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation* **2010**:1-7.