

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra obecné zootechniky a etologie



**Vliv genotypu CXCR1 na dojivost a zdraví vemene
českého strakatého skotu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Mičulková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ing. Ivan Majzlík, CSc.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv genotypu CXCR1 na doživost a zdraví vemene českého strakatého skotu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Mgr. Ing. Ivanu Majzlíkovi, CSc. za vedení práce, Ing. Kateřině Ječmínkové za vedení a dohled v laboratoři, konzultace a veškeré podněty. Také děkuji svému zaměstnavateli a všem svým kolegům za vstřícnost. Rovněž děkuji své rodině a přátelům za veškerou podporu.

Vliv genotypu *CXCR1* na dojivost a zdraví vemene českého strakatého skotu

Souhrn

Mastitida je nejrozšířenějším onemocněním v chovu skotu. Ovlivňuje mléčnou užitkovost krav a způsobuje značné ekonomické ztráty. Jedná se o zánětlivý proces v mléčné žláze, během něhož se uplatňují buňky vrozené imunity, zejména neutrofilů, které jsou do postižené oblasti přiváděny prostřednictvím chemotaxe. Chemoatraktivní látky stimulují receptory na povrchu neutrofilů a tím zprostředkovávají imunitní reakci. Tyto receptory pro chemotaktické interakce a tedy účinnost imunitní odpovědi zvířat mají genetický základ, který se může uplatnit při šlechtění. Jedním z receptorů, kterým je věnována pozornost několika studií je chemokinový receptor *CXCR1*. Vztah mezi polymorfismem genu pro tento receptor, zdravím vemene a dojivostí byl doposud publikován u holštýnského a jerseykého skotu v různých zemích.

Cílem této práce bylo vyhodnotit vliv polymorfních variant genu *CXCR1* +777 C/G na výskyt somatických buněk v mléce a dojivost českého strakatého skotu. Během tří laktací bylo pozorováno celkem 298 dojnic ve čtyřech různých chovech. Jejich genotypy byly stanoveny metodou PCR-RFLP. Získané údaje byly statisticky vyhodnoceny prostřednictvím modelu GLM v programu SAS 9.4. Ve sledovaném souboru byly zjištěny genové frekvence C = 0,36 a G = 0,64. Hodnocení dojivosti a výskytu somatických buněk proběhlo jednotlivě za každou laktaci. Vyhodnocením pomocí modelu GLM nebyl prokázán vliv genotypu na zdraví vemene ani dojivost. Tato práce je vůbec prvním pozorováním polymorfismu *CXCR1*+777 C/G na českém strakatém skotu.

Klíčová slova: český strakatý skot, somatické buňky, dojivost, polymorfismus, *CXCR1*, mastitida, zdraví vemene

Relationship between CXCR1 genotype with milk yield and udder health in Czech Fleckvieh cattle

Summary

Mastitis is the most spread disease in cattle farming. It influences milk yield of the dairy cattle and causes high economic losses. Mastitis is an inflammation of breast tissue, during which the innate immune cells mostly neutrophils are utilized. The neutrophils migrate to the site of injury by chemotaxis. Chemoattractants stimulate receptors on the surface of neutrophils, and trigger the immune reaction. Selection based on gene variants of these receptors can be used in breeding. One of these receptors, studied by many researches, is chemokine receptor *CXCR1*. The relationship between polymorphism of the receptor's gene, the health of the udder and milk yield have been published for Holstein and Jersey cattle in many countries.

The goal of this study was to evaluate the influence of polymorphic variants of the *CXCR1+777 C/G* gene on the occurrence of somatic cells in milk and milk yield of Czech Fleckvieh cattle. 298 dairy cattle of four different breeds were observed during three lactations. Their genotypes were determined by PCR-RFLP method. Results were analyzed by GLM model in SAS 9.4.

The gene frequency of C = 0,36 and G = 0,64 has been determined in the tested group. The evaluation of milk yield and occurrence of the somatic cells was performed per each lactation separately. The influence of different *CXCR1 + 777* genotypes on udder health of the udder or milk yield was not confirmed by GLM model. This thesis is the first observation of *CXCR1+777 C/G* polymorphism on Czech Fleckvieh cattle.

Keywords: Czech Fleckvieh cattle, Mastitis, udder health, milk yield, somatic cells, polymorphism, CXCR1

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce a hypotéza	2
2.1	Cíl práce	2
2.2	Hypotéza	2
3	Rešerše	3
3.1	Český strakatý skot	3
3.1.1	Historie Českého strakatého skotu.....	3
3.1.2	Šlechtění a chovný cíl českého strakatého skotu	4
3.2	Mléčná užitkovost a složení mléka	5
3.2.1	Složení mléka a jeho změny v důsledku mastitidy	6
3.2.2	Hlavní ukazatele kvality	6
3.3	Zdraví vemene	8
3.3.1	Mastitida	9
3.4	Imunologie mléčné žlázy	12
3.4.1	Imunitní mechanismy vemene	12
3.4.2	Imunocyty	13
3.4.3	Neutrofilý.....	14
3.4.4	Chemotaxe	15
3.4.5	Cytokiny.....	16
3.4.6	<i>CXCR1</i>	16
3.4.7	Polymorfismus <i>CXCR1</i>	17
3.5	Genomika	19
3.5.1	Markery asistovaná selekce	20
4	Materiál a metodika	21
4.1	Izolace DNA a genotypování	21
4.2	Statistické vyhodnocení	25
5	Výsledky	27
5.1	Základní statistiky	27
5.2	Hardy-Weinbergova rovnováha	27
5.3	Vliv genotypu na doživost	27
5.4	Vliv genotypu na skóre somatických buněk	28

6	Diskuze	29
6.1	Hardy-Weinbergova rovnováha	29
6.2	Vliv genotypu na doживost	30
6.3	Vliv genotypu na zdraví vemene	31
7	Závěr	33
8	Samostatné přílohy	34
9	Seznam literatury	37
	Seznam Příloh	57

1 Úvod

Cílem chovatelů a šlechtitelů je vždy co největší efektivita chovů, tedy produktivita a s tím spojené zdraví zvířat. Během posledních desetiletí již bylo dosaženo značného zlepšení primárních produkčních vlastností skotu. Svůj podíl na tom nese umělá inseminace, kontroly užitkovosti a selekční postupy. Cíleným šlechtěním na užitkové vlastnosti však u dojeného skotu dochází ke snížení jeho funkčních (sekundárních) znaků. V užitkových chovech se tak velmi často vyskytují mastitidy, které představují značný chovatelský i ekonomický problém. Toto onemocnění zvyšuje náklady chovu, snižuje užitkovost a ovlivňuje finanční hodnocení mléka.

Na zdraví i užitkovosti skotu se podílí jak vlivy prostředí, tak genetické založení zvířat. Předmětem zájmu chovatelů i odborníků se tak vedle způsobů zlepšování welfare a technologií chovu stávají také genetické předpoklady stád. Současné šlechtění využívá nástroje molekulární genetiky i konvenční postupy fenotypového hodnocení a spojuje je tak v účinný způsob zlepšování vlastností populace. Uplatňují se genomické hodnocení zvířat a markery asistovaná selekce, které šetří čas i původní náklady na genetický pokrok. Jedná se o postupy, které prostřednictvím identifikace polymorfismů genů a jejich vztahu k fenotypovému projevu usnadňují genetický pokrok. Jsou-li známy principy zodpovědné za úspěšnou imunitní odpověď organismu i jejich genetické podmínění, lze díky genotypování selektovat jedince s horšími produkčními vlastnostmi a náchylností k ekonomicky významným onemocněním jako je právě mastitida.

V poslední době byla věnována značná pozornost polymorfismu genu *CXCR1* v souvislosti s mléčnou užitkovostí a imunitní odpovědi při zánětu vemene. Publikované výsledky některých studií na různých plemenech skotu naznačují, že právě selekce podle polymorfismu tohoto genu by mohla být značným přínosem pro zdraví vemene a užitkovost skotu. Zatím jsou známy studie na holštýnském a jerseyškém skotu.

2 Cíl práce a hypotéza

2.1 Cíl práce

Cílem práce je vyhodnotit vztah mezi polymorfními variantami genu pro CXC chemokinový receptor 1 (CXCR1), dojivostí a zdravím vemene krav českého strakatého skotu.

2.2 Hypotéza

Dojnice s mutovanou alelou genu pro CXC chemokinový receptor 1 vykazují vyšší dojivost než dojnice s alelou nemutovanou.

Dojnice s mutovanou alelou genu pro CXC chemokinový receptor 1 vykazují nižší počet somatických buněk v mléce než dojnice s alelou nemutovanou.

3 Rešerše

3.1 Český strakatý skot

Český strakatý skot je tradičním plemenem skotu na území České republiky. Patří do celosvětové populace strakatých plemen (Fleckvieh) shodného fylogenetického původu, která se pro svoje vynikající vlastnosti a široké využití rozšířila na všechny kontinenty. V České republice zaujímá český strakatý skot přibližně jednu polovinu celkových stavů skotu (ČESTR, 2008a).

3.1.1 Historie českého strakatého skotu

Plemeno má původ ve Švýcarsku, v krvi Bernsko-Simentálského skotu, což je červenostrakaté plemeno velkého tělesného rámce. Do českých zemí se toto plemeno dostalo ve druhé polovině 19. století dovozem plemenných býků na velkostatek Napajedla. Následně došlo ke křížení s domácími kravami, většinou s českou červinkou. Tak se plemeno v českých zemích začalo rozšiřovat nejprve na Hanou, ale časem příliv švýcarské krve ovlivnil populaci skotu i v ostatních oblastech českých zemí (ČESTR, 2008a). Vzniklo tak několik místních krajových rázů českého červenostrakatého skotu, které byly ve 30. letech 20. století sloučeny do jediného plemene. Od roku 1923 se začala uplatňovat kontrola užitkovosti a to zejména při výběru býků pro další plemenitbu (Botto et al., 1984). Postupy selekce a vývoj plemene se značně zpozdil v období druhé světové války. V šedesátých letech minulého století se v rámci plemene začalo uplatňovat zušlecht'ovací křížení s plemeny ayshire, švédským černobílým skotem a dánskou červinkou za účelem zlepšení důležitých vlastností českého strakatého skotu, především dojivosti. Začátkem 70. let 20. století se začali využívat i býci holštýnského plemene (Urban et al., 1997). Od záměrného křížení se později upustilo a od 90. let 20. století se plemeno zušlecht'uje pouze býky fylogeneticky příbuzných strakatých plemen.

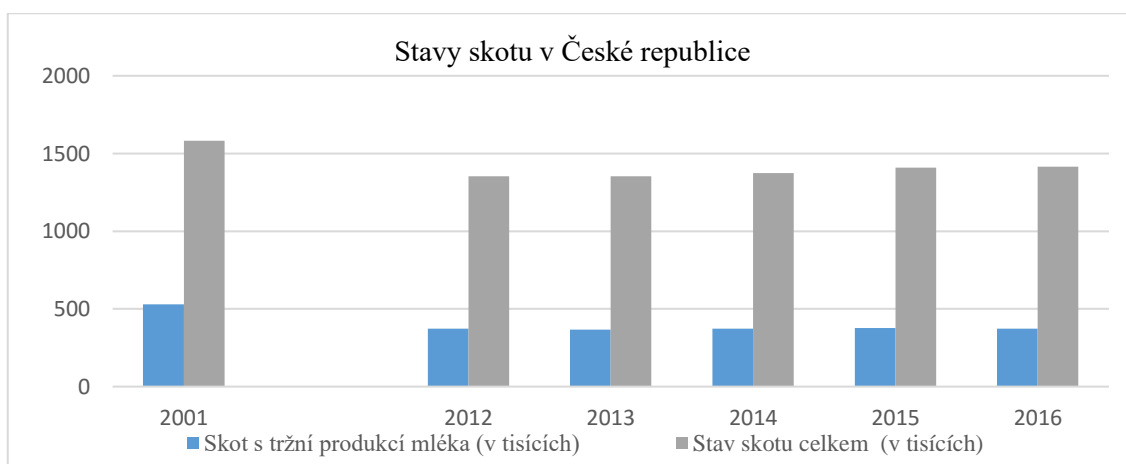
Svůj současný název nese plemeno od roku 1967 a plemenná kniha je vedena od roku 1994. V roce 2010 byla populace původního (nezušlechtěného) typu zařazena do programu uchování původních genetických zdrojů (ČESTR, 2012; Národní středisko pro genové zdroje).

3.1.2 Šlechtění a chovný cíl českého strakatého skotu

Vývoj v oblasti chovu a šlechtění strakatého skotu jsou procesy realizované podle schváleného šlechtitelského programu, který je zaštitěn Svazem chovatelů českého strakatého skotu. Jedná se o uznané chovatelské sdružení pro český strakatý skot, jemuž přísluší zodpovědnost za vedení plemenné knihy, definici a aktualizaci chovného cíle a šlechtitelského programu (ČESTR, 2008b).

Chovatelé strakatého skotu jsou na evropské úrovni sdruženi do Evropského sdružení chovatelů strakatého skotu (Europäische Vereinigung der Fleckviehzüchter – EVF) se sídlem v Mnichově. Sdružení EVF bylo založeno v roce 1962 tamtéž. Světová federace Simmental-Fleckvieh pak byla založena o 10 let později při příležitosti konání 11. kongresu EVF v Záhřebu (Skládanka et al., 2014). Mezinárodní spolupráce se uplatňuje i na úrovni genomického hodnocení skotu. Prostřednictvím databáze DAC se shromažďují a vyhodnocují genomická data (za použití celkového složeného indexu GZW - Gesamtzuchtwert) pro strakatý skot České republiky, Německa a Rakouska. Od roku 2009 byly zavedeny plemenné hodnoty masné užitkovosti, o dva roky později bylo zavedeno hodnocení exteriéru a od roku 2014 jsou do společného výpočtu implementovány plemenné hodnoty pro mléčnou užitkovost. V současnosti se připravuje zavedení společných plemenných hodnot pro znaky fitness. Ve společných výpočtech zastupují česká data o strakatém skotu 11% (Prýmas, 2015; Velechovská, 2016). Vlivem politiky EU, prodejních cen mléka i zvyšující se užitkovosti dojnic dochází v České republice během posledního desetiletí k poklesu stavů skotu. Přes tento trend představuje český strakatý skot, s počtem 159 000 krav v plemenné knize a přímým napojením na populaci rakouskou a německou, čtvrtou nejrozsáhlejší populaci červenostrakatého skotu v Evropě (Skládanka et al., 2014).

Graf č.1: Přehled stavů skotu v České republice: Vytvořeno na základě údajů z výročních zpráv ČMSCH 2006 a 2015



Pro toto plemeno je charakteristický střední až větší tělesný rámec s přiměřeně silnou kostrou a dobrým osvalením. Jedná se o skot kombinovaného produkčního zaměření se zvýrazněnými znaky mléčnosti. Exteriér vyniká hlubokým, prostorným hrudníkem a dobře utvářenou zádí. Vemeno má polovejčitý tvar (ČESTR, 2008a).

Chovným cílem plemene je v současnosti zlepšování funkčních vlastností s ohledem na mléčnou i masou produkci a dobrý zdravotní stav. V oblasti mléčné užitkovosti je dlouhodobým cílem užitkovost 6000 až 7500 kg mléka za laktaci, s obsahem bílkovin nejméně 3,5 %. Poměr obsahu bílkovin a tuku v mléce by měl odpovídat 1:1,15 - 1,20. Cílem masné užitkovosti je pak přírůstek nad 1300 g denně v intenzivním výkrmu býků a jatečná výtěžnost nad 58 %. Těchto parametrů již dosahuje řada předních chovů v současnosti. Mezi požadavky ukazatelů fitness jsou uváděny zejména dlouhověkost, 4-5 laktací a střední ranost (ČESTR, 2012)

3.2 Mléčná užitkovost a složení mléka

Mléčná užitkovost patří u skotu mezi hlavní užitkové vlastnosti. Přijaté živiny umí skot přetvářet na plnohodnotnou mléčnou bílkovinu dvakrát až dvaapůlkrát výhodněji než na maso. Přičemž se tímto způsobem zhodnocují i zdroje živin pro člověka jinak nevyužitelné (např. travní porosty) (Louda et al., 1999).

Úroveň mléčné užitkovosti je u skotu podmíněna genetickým založením dojnice a vlivy vnějšího prostředí. Optimální prostředí umožňuje dojnici realizovat její genetické předpoklady pro produkci mléka a jeho složek. Nejvýznamnějším efektem vnějšího prostředí je úroveň výživy a krmení, která se spolu s managementem stáda podílí na výši mléčné užitkovosti z 60 - 70 %. Obecně lze říci, že samotná dojivost je nízce až středně dědivá ($h^2 = 0,25 - 0,30$), produkce mléčných složek - bílkovin a tuku je středně dědivá ($h^2_{\text{bílkoviny}} = 0,50 - 0,60$ a $h^2_{\text{tuk}} = 0,40$) (Fleming et al., 2017)

Mléčná užitkovost a složení mléka závisí na množství a kvalitě látek přiváděných krví do mléčné žlázy a na intenzitě její činnosti. Laktace krav má dvě fáze, po otelení začíná vzestupná fáze laktace, během níž se denní produkce mléka postupně zvyšuje. Toto období se označuje jako rozdojování a trvá do 30. – 60. dne laktace. Po dosažení nejvyšší denní dojivosti následuje sestupná fáze laktace, během které denní produkce mléka klesá až do zaprahnutí (Atashi et al., 2013).

3.2.1 Složení mléka a jeho změny v důsledku mastitidy

Složení kravského mléka odpovídá 87,5 % vody a 12,5 % sušiny, z čehož je 4,7 % laktózy, 3,8 % tuku, 3,3% bílkovin a 0,7 % popelovin (Pešek et al., 1997). Procentuální obsah laktózy je během fází laktace poměrně stálý. Obsah ostatních základních složek se během rozdojování nepravidelně snižuje a v následující sestupné fázi naopak pomalu stoupá (Skládanka et al., 2014).

S výskytem mastitid jsou spojeny změny v zastoupení mléčných složek. Příkladem toho je pokles laktózy nebo změny v obsahu bílkovinných složek (Alhussien et al., 2016). Během zánětu vemene klesá zastoupení kaseinu a rostou koncentrace imunoglobulinů (Coulona, et al., 2002). Tyto změny jsou způsobeny reakcemi imunitního systému na patogeny. Watanabe et Yagi (2008) uvádějí přímou souvislost mezi uvolněním některých cytokinů a potlačením produkce některých specifických mléčných proteinů. Vztah mezi výskytem zánětu vemene a obsahem tuku v mléce je dosud nejasný (Le Maréchal et al., 2011).

3.2.2 Hlavní ukazatele kvality

Podle evropské legislativy - Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 v platném znění, jsou stanovena zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Za klíčové ukazatele jsou považovány následující: celkový počet mikroorganismů, který u standardního mléka nesmí překročit $100\,000\text{ ml}^{-1}$ a počet somatických buněk s limitem $400\,000\text{ ml}^{-1}$, bod mrznutí mléka, nesmí překročit $-0,520^{\circ}\text{C}$, rezidua inhibičních látek se nesmí vyskytovat vůbec. Mezi ukazateli kvality mléka významně figurují hodnoty celkového počtu mikroorganismů (CPM) a somatických buněk (SC).

Celkový počet mikroorganismů

V případě CPM se jedná o počet všech mikroorganismů přítomných v mléce (Doležal, 2000). Typickými zástupci těchto mikrobů jsou bakterie rodu *Bacillus* a *Micrococcus* (Kivaria et al., 2006). Hodnota CPM charakterizuje celkovou hygienu dojení a ošetřování mléka, avšak nijak nenaznačuje na zdravotní stav dojnic (Doležal, 2000). Zdrojem CPM v mléce může být infikovaná mléčná žláza a kontaminované ústí strukového kanálku, ale i všechny mikrobiologicky kontaminované povrchy, které během dojení a skladování přijdou do styku s mlékem (Ruegg et al., 2006).

Somatické buňky

Tyto buňky byly pojmenovány v roce 1963 (angl. somatic cells) (Pappe et al.). Jejich počet a zastoupení jsou považovány za charakteristiku zdravotního stavu mléčné žlázy. Podle původu lze rozlišit SC dvojího druhu, a to krevní nebo epiteliální. S objevem SC v mléce byl původně spojen předpoklad, že buňky epitelů mléčné žlázy jsou hlavním typem SC obsažených v mléčné žláze. V současnosti se uvádí, že zastupují pouze minimum z celkového počtu somatických buněk v mléce. Somatické buňky epiteliálního původu se mohou uvolňovat například ze sekrečních alveolů anebo dutinového systému. K jejich uvolňování z tkáně dochází při regeneračních a reparativních procesech (Harmon, 1994). V případě krevních SC se jedná především o leukocyty, které přecházejí do mléčné žlázy a mléka z krve (Pillai et al., 2001; Tančin, 2013). Úkolem leukocytů v organismu je eliminovat infekci, reparovat poškozené buňky mléčné žlázy a podílet se na jejím uzdravení.

Somatické buňky jsou v mléce obsaženy ve všech fázích laktace. Jejich zvýšený výskyt lze pozorovat ve spojitosti se zdravotními problémy v mléčné žláze, metabolickými poruchami (acidóza, alkalóza, ketóza apod.) během jejich chronického průběhu. Akutní stavy metabolických onemocnění bývají rovněž provázeny výskytem mastitid (Sordillo, 2016). Nejvýznamněji se na zvýšení počtu somatických buněk (SCC somatic cells count) v mléce podílí zánětlivé onemocnění mléčné žlázy - mastitida, během něhož se počet somatických buněk zvyšuje až o několik řádů v jednom mililitru mléka (Van Straten et al 2009; Bytyqi et al., 2010). Přítomností SC v mléce se značně zhoršují jeho kvalitativní vlastnosti i další technologická zpracovatelnost (Bobbo et al., 2016), proto s hodnotami SC v mléce souvisí finanční hodnocení mléka. Zároveň jsou hodnoty tohoto ukazatele považovány za průkazný indikátor onemocnění mastitidou.

Úroveň zdraví mléčné žlázy z pohledu počtu SC je limitována hodnotou $100\ 000.\text{ml}^{-1}$ ve čtvrtém vzorku pro dojnice na první laktaci. Pro starší krávy jsou mezními hodnotami $150\ 000$ až $200\ 000.\text{ml}^{-1}$ (Harmon, 1994). Pro zpracování dat při rozlišování zdravých a nemocných dojnic se stavy SC se vyjadřují jako skóre počtu somatických buněk (SCS z angl. somatic cell score). Skórování probíhá logaritmickým přepočtem podle následujícího vzorce:

$$\text{SCS} = \log_2 (\text{SCC v 1 ml}/100\ 000) + 3$$

V případě hodnocení SCS za celou laktaci se stanovuje aritmetický průměr SCS jako tzv. laktační skóre (angl. lactation average somatic cell score, LSCS) (Ali et Shook, 1980; Wiggans et Shook, 1987).

3.3 Zdraví vemene

Mléčná žláza je fylogeneticky modifikovaná kožní žláza. Ontogeneticky vzniká ve velmi ranném období u obou pohlaví, ovšem do plně funkčního stavu se vyvíjí pouze u samic. Až do pohlavní dospělosti jalovice (cca 9 měsíců) vemeno roste úměrně tělu zvířete, zahájením funkcí pohlavních hormonů, tj. estrogeneru a progesteronu dochází k dalšímu rozvoji mléčné žlázy, dále pak k rozvoji kanálků a jejich diferenciaci v alveoly. Ve věku 18ti měsíců již mívají jalovice v mléčné žláze plně vyvinutý kanálkový systém. Avšak nejvýznamnějším podnětem k úplnému rozvoji vemene je březost (Reece, 2009; Doležal et al., 2015).

Anatomicky se jedná o tubuloalveolární žlázu složenou ze čtyř samostatně funkčních čtvrtí. Epiteliální tkáň je popsána jako parenchym. Vmezežené vazivo, které plní nosnou funkci vemene, je označováno jako stroma (Frandsen et al., 2009). Základní funkční jednotkou je sekreční alveolus. Množství alveolů spojených dohromady tvoří lobulus (lalůček), ten je obklopen cévami a myoepitelovými (kontrakčními) buňkami. Lobulus vyúsťuje do nitrolalůčkového vývodu, odvádí mléko do mlékojemu uvnitř žlázy, dále pak do mlékojemu struku a konečně strukovým kanálkem ven z vemene (Reece, 2009). Z morfologických vlastností vemene jsou pro užitkovost nejdůležitější jeho velikost, tvar, výška upnutí a rozmístění struků (Bouška, 2006). Produkční schopnost mléčné užitkovosti dojnice závisí na následujících funkčních vlastnostech vemene, které spolu ale úzce souvisí. Jedná se o sekreci mléka, tedy jeho syntézu a uvolňování z jednovrstevného alveolárního epitelu. Také o shromažďování mléka v alveolách, mlékovodech a v mléčné cisterně, a konečně o spouštění mléka, kterým se rozumí pasivní i aktivní uvolňování mléka z vemene (Reece, 2009; Doležal et al., 2015). Tvorba mléka probíhá ve vemeni kontinuálně, ale s různou intenzitou. Nejintenzivněji se mléko tvoří po vydojení vemene, kdy poklesne vnitrovemenní tlak. Postupným naplňováním vemene mlékem a stoupajícím vnitrovemenním tlakem se snižuje přítok krve k alveolám a sekrece mléka ustává. Tvorba mléka se pak zastavuje při vnitrovemenním tlaku 3,9–5,2 kPa (Skládanka et al., 2014).

Ve zdravém vemeni bývá zastoupeno malé množství mikroorganismů, jedná se zejména o gram pozitivní koky – streptokoky, stafylokoky a mikrokoky (Woodward et al., 1987), dále bakterie mléčného kvašení (Greene et al., 1991) a korynebakteria (Pankey et al., 1985). Tito mikrobové jakožto komenzálové mléčné žlázy mohou částečně působit i jako inhibitoři masitidních patogenů (Al-Qumber et Tagg, 2006). Stejně tak na povrchu mléčné žlázy a struků bývá zastoupeno množství mikrobů. Zde se jedná o typickou kožní mikroflóru, kterou doplňují

mikroorganismy pocházející z půdy, podestýlky, výkalů a krmiva (Rendos et al., 1975). Tuto mikroflóru obvykle tvoří směs koliformních bakterií a dalších mikroorganismů, které při dojení mohou kontaminovat mléko. Z patogenních mikroorganismů mohou být přítomny salmonely, *Campylobacter spp.* (Sato et al., 2004) či *Listeria monocytogenes* (Botsaris et al., 2016). Stavby a druhové zastoupení mikroorganismů kolísají zejména v závislosti na způsobu ustájení dojníc (Rendos et al., 1975).

Základním předpokladem pro omezení většiny (až 75 %) mikrobiální kontaminace mléka je tedy správně provedená toaleta vemene před vlastním dojením a ošetření struků po dojení (Ruegg, et al., 2006; Bade et al., 2008; Morton et al, 2014). Mezi hygienou dojení (jako součinem čistoty strukových nástavců, vody a utěrek k péči o vemena, současného dojení zdravých a nemocných krav) a výskytem mastitid je prokázán úzký vztah. Zároveň jsou popsány i souvislosti mezi čistotou končetin a výskytem onemocnění vemene (Schreiner et Ruegg, 2003). Tyto faktory jsou nejen příčinami kontaminace mléka, ale i infekce vemene a dalšího šíření infekce ve stádě a jeho prostředí. Stejně tak samotné dojení významně ovlivňuje zdravotní stav vemene. Vlivem nevyhovujících technologií, nedostatečného vydojení vemene nebo vynechávání dojení může dojít k narušení funkce a onemocnění mléčné žlázy (Bade et al., 2008; Dohmen et al., 2010).

Vemeno skotu je orgánem vystaveným také značné nefyziologické zátěži. Přichází do kontaktu s mnohými infekčními organismy i běžnými mikroorganismy prostředí, které strukovým kanálkem pronikají dále do mléčné žlázy a způsobují zánět. Vemeno je dále citlivé na podchlazení, otlaky a zhmoždění (Strapák et al., 2013). Protože primární funkcí vemene je sekrece mléka, čili zajištění výživy mláděte, obranyschopnost dojnice tak ustupuje na úkor zdraví vemene. Uvádí se, že k poklesu imunitních schopností zároveň dochází i vlivem selekce na mléčnou užitkovost (Fleischer et al., 2001; Sordillo et Streicher, 2002).

3.3.1 Mastitida

Charakteristika a klasifikace onemocnění

Zánět mléčné žlázy (Mastitis) je popisován jako polyfaktoriální a polyetiologické onemocnění, na němž se ve vzájemné interakci podílí tři základní činitelé. A to makroorganismus (dojnice), mikroorganismus (mikrobiální původci mastitid) a vlivy vnějšího prostředí (Hofírek, 2009). Zánětlivým procesem ve vemeni se rozumí obranná odpověď

organismu na porušení vlastní integrity provázené buněčnou nekrózou. Imunitní systém reaguje prostřednictvím komplexu homeostatických procesů imunitního systému. (Krejsek et Kopecký, 2004a; Toman, 2009). Studie uvádějí velmi nízkou heritabilitu mastitid, $h^2 = 0,025$ (El-Awady et al., 2011), nebo $h^2 = 0,025 - 0,012$ (Sørensen, et al., 2009), případně v rozmezí $h^2 = 0,01 - 0,042$ podle původce a pořadí laktace, během které se onemocnění vyskytlo (Nash et al., 2000).

Dle klinických, epizootologických, patologicko-morfologických a hygienických aspektů existuje několik klasifikací mastitid. Z klinického pohledu se rozlišují mastitidy per akutní, akutní a chronické (Tighe et Brown, 2015). Symptomaticky jsou charakterizovány klinické nebo subklinické záněty mléčné žlázy (Rupp et Boichard, 2003). Etiologicky se mastitidy rozlišují na dvě skupiny, a to na onemocnění vývodných cest, při nichž se uplatňují mikrobiální původci a jedná se tedy o infekční mastitidy (Piepers et al., 2007). Druhou variantou je onemocnění mléčné žlázy neinfekční povahy, způsobené například traumatem, nesprávným dojením, teplotními nebo alimentárními vlivy, případně chemickými a toxickými příčinami (Ruegg et al., 2006; Hovinen et Pyörälä, 2011). Mohou se na něm zároveň podílet i faktory fyziologické, které zahrnují počet laktací a jejich průběh, plemennou příslušnost nebo pohlavní cyklus (Makovec et Ruegg, 2003; Olde Riekerink et al., 2007; Langoni et al., 2011). Infekční mastitidy postihují jednotlivé čtvrtě mléčné žlázy a často navazují na mastitidy neinfekčního charakteru. Původci těchto mastitid jsou bakterie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* (Bochniarz et al., 2016), *Escherichia coli* (Wall et al, 2009), *Klebsiella* (Kanevsky-Mullarky et al., 2014) a další. Při velmi silném postižení mléčné žlázy dochází k celkové alteraci organismu dojnice. Nastupují vysoké horečky, nechutenství a může dojít k zastavení mléčné produkce, případně k septickému šoku a úhynu (Jagoš et al., 1985).

Z epizootologického pohledu lze infekční mastitis rozlišit environmentální a kontagiózní. Kontagiózní mastitida se mezi zvířaty přenáší díky špatné hygieně dojení. Typickými původci jsou bakterie rodu *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (Bochniarz et al., 2016), a *Mycoplasma spp.* (Fox et al., 2005) Původci environmentální mastitidy se běžně vyskytují v převážně vlhkém prostředí stáje a nakonec i dojíren. Nejčastěji se jedná o koliformní bakterie (*E. Coli*, *Klebsiella spp.* a *Enterobacter*) a environmentální streptokoky (*S. uberis* a *S. dysgalactiae*)(Garcia, 2004), kteří většinou běžně kolonizují pokožku vemene a posléze mohou vniknout strukem dovnitř právě během dojení. Jako prevence je doporučován důraz na toaletu během dojení, tedy hygienu, suché utěrky a ošetření pre a postdippingem (Schreiner et Ruegg, 2003).

Klinická kategorizace mastitid charakterizuje stavy vemene od zdravé mléčné žlázy až po klinickou formu mastitidy. Jako nejlehčí formu onemocnění a mezistupeň mezi zdravou mléčnou žlázou a mastitidou rozlišuje latentní infekci, při níž se počet somatických buněk pohybuje pod kritickou hodnotou. Mléko vykazuje normální složení a fyzikální vlastnosti, ovšem v sekretu se vyskytují mikrobiální patogeny (Grieger et al., 1990). Dále je definována aseptická mastitida (také označovaná jako nespecifická), při níž obsah SC stále zůstává pod kritickou hodnotou, ale chemické složení a fyzikální vlastnosti mléka se již mění. V mléce nemusí být diagnostikovány mikrobiální patogeny.

Subklinickou mastitidu charakterizuje SCC, který dosáhl či překračuje kritickou hodnotu. Složení i fyzikální vlastnosti mléka jsou změněné a v jeho obsahu jsou prokázány mikrobiální patogeny. Jedná se o nejrozšířenější formu zánětu vemene, která zodpovídá za největší ztráty ve většině stád. Někdy se označuje také jako „skrytá mastitida“, protože není indikována otoky a může být přehlédnuta. Při neléčeném průběhu může přejít ve formu akutní nebo i chronickou, kdy parenchym mléčné žlázy atrofuje a přestává produkovat mléko. V nadojeném mléce se během subklinické mastitidy objevují vločkovité útvary (Hejlíček et al., 1987). Pro detekci této formy onemocnění se využívá NK test před samotným dojením u zvířat s podezřením na onemocnění. Dojnice se subklinickou mastitidou jsou zdrojem kontagiózní nákazy pro ostatní zvířata v chovu (Makovec et Ruegg, 2003).

Akutní klinická mastitida se projevuje typickými příznaky zánětu (dolor, calor, rubor, oedema, functio laesa) a je spojena s prudkým poklesem dojivosti. Změny v mléce jsou sensoricky rozpoznatelné a dotek na vemeni je pro dojnici bolestivý (Fogsgaard et al., 2015). Při perakutním průběhu dochází v zasažených čtvrtích vemene k sekreci mléku již nepodobného sekretu, kontaminovaného hnisem někdy i krví (Wall et al., 2016). Tento průběh lze označit také jako parenchymatózní mastitidu, protože se jedná o postižení mlékovodného parenchymu. Pokud zánět postihuje převážně vývodný dutinový systém, sekrece zůstává zachována a mléko je mírně kontaminováno zánětlivými elementy, hovoří se o katarální mastitidě (Jagoš et al., 1985).

Ekonomické dopady mastitid

Onemocnění ovlivňuje nejen zdraví a welfare zvířat, ale i příjmy zemědělských podniků. Kvalitativní i kvantitativní změny ve složení mléka a jejich stupeň závisí na intenzitě a době trvání onemocnění. Dochází ke změnám sensorických vlastností mléka, zastoupení hlavních mléčných složek i ke změně fyzikálně-chemických a technologických vlastností

mléka. Díky těmto změnám klesá nutriční hodnota mléka i jeho technologická zpracovatelnost (Bobbo et al., 2016; Le Maréchal et al., 2011).

Ekonomiku podniků tak mastitidy ovlivňují především snížením produkce mléka, případným snížením jeho nákupní ceny s ohledem na ukazatele kvality (CMP a SCC), vyřazením mléka z dodávky při použití antibiotik nebo případným vyřazováním krav. Současně jdou s těmito ztrátami ruku v ruce zvýšené náklady na obměnu stáda, léčiva, veterinární ošetření a také na větší péči, tedy na více práce zaměstnanců. U prvotek mohou ztráty v nádoji dosahovat až 690 kg za celou laktaci a téměř 1200 kg za celou laktaci u starších dojníc (Wilson et al., 2004). Odhady průměrných celkových nákladů na mastitidu v Holandsku odpovídají asi 6500 Kč na jednu dojící krávu ročně. Tyto odhady zahrnují nejen náklady přímé (produkční ztráty, léčbu nebo i vyřazení dojnice), ale zároveň je zohledněno, že chovatelé investují čas i peníze do prevence a kontrol výskytu onemocnění (Van Soest et al., 2016). V amerických chovech se předpokládané roční ztráty pohybují mezi 30 a 60 miliardami korun, tedy zastupují až 11% z celkové mléčné produkce (Ferrero et al., 2014). V českých podmínkách se uvádí průměrná ztráta mléka 565 kg na jeden výskyt onemocnění (Kvapilík, 2014a), což odpovídá finanční ztrátě 9000 Kč (Kvapilík, 2014b).

Skóre výskytu mastitid v chovech dojeného skotu je uváděno mezi 25 – 60% (Ruegg, 2003). Mastitidy tak představují nejčastější a ekonomicky nejzávažnější problém mléčné produkce v celosvětovém měřítku (Osteras, 2006).

3.4 Imunologie mléčné žlázy

3.4.1 Imunitní mechanismy vemene

Primárně imunitní systém rozlišuje prvky infekčního původu, které mohou potenciálně poškozovat organismus, reaguje na signály vycházející z vlastních buněk a tkání, případně reaguje na jejich poškození (Krejsek et Kopecký, 2004a). Imunitní schopnosti vemene závisí na probíhající fázi laktace. Typicky je mléčná žláza vystavena depresi a stresu obzvláště v obdobích zasušování, porodu a rozdojování, během kterého se může dojnice dostat do negativní energetické bilance. S těmito fázemi je spojena i vyšší náchylnost k mastitidám a systémovým onemocněním (Mol et Clegg, 2000; Sordillo, 2005; Moyes et al., 2010).

Imunologická reakce mléčné žlázy závisí na součinnosti specifických a nespecifických mechanismů imunity, včetně anatomických vlastností vemene, buněčných i humorálních obranných složek (Sordillo et al., 1997). Specifickými adaptivními mechanismy se rozumí mechanismy humorální, založené na protilátkách a mechanismy buněčně zprostředkované, založené hlavně na T-lymfocytech a B-lymfocytech (Hořejší, 2013). Tyto mechanismy jsou evolučně mladší a jsou charakteristické imunologickou pamětí (Riollet, 2000). Specifická imunita je však v reakci na nové podněty a infekce poněkud pomalá (Golden et al., 2009). První kontakt s patogeny po tom, co pronikly strukovým kanálkem, tedy přísluší nespecifické imunitě. Kombinací těchto dvou mechanismů imunitní odpovědi lze dosáhnout účinné obrany organismu (Uthaisangsook et al., 2002; Golden et al., 2009;).

Nespecifická imunita zastává důležitou roli při ochraně vemene proti infekci prostřednictvím svých dvou základních schopností. Jsou jimi detekce chemických struktur, typických pro patogeny a spouštění prozánětlivé odpovědi, což se děje komplexními interakcemi buněčných a molekulárních procesů. Cílem je zajištění a následné odstranění škodlivých patogenů, které způsobují zánět (Uthaisangsook et al., 2002; Gray et al., 2005; Hořejší, 2013;).

Zánět představuje komplexní adaptační reakci těla na zátěž, jako na soubor biologických i nebiologických podnětů, které ve svém důsledku mohou narušit homeostázu organismu (Krejsek et Kopecký, 2004a). Na udržení homeostázy, která je tedy primárním cílem zánětlivého procesu, se podílí imunitní systém společně s neuroendokrinní regulací, jež identifikuje nežádoucí změny vycházející z vnějšího nebo vnitřního prostředí (Ferrero-Miliani et al., 2006).

V průběhu zánětu se organismus adaptuje na zátěžovou situaci, dochází k tlumení anabolických aktivit metabolismu a omezení výstavby tělních struktur a naopak jsou mobilizovány energetické rezervy. Na zánětlivé reakci mají bezprostředně podíl kromě humorálních a buněčných systémů také buňky endotelové, keratinocyty, fibroblasty a klíčovou roli zaujímá mezibuněčná hmota, v níž probíhá efektorová fáze zánětu (Krejsek et Kopecký, 2004a).

3.4.2 Imunocyty

Buňky imunitního systému vznikají v primárních lymfatických orgánech, kterými jsou thymus a kostní dřeň. Tamtéž probíhá diferenciací a zrání imunokompetentních buněk.

Prostředím pro antigenně specifické reakce jsou pak sekundární lymfatické orgány, které jsou zastoupeny slezinou a lymfatickými uzlinami (Hořejší, 2013).

Hlavními buňkami imunitního systému jsou leukocyty, které zastupují majoritní podíl všech imunocytů. Vznikají z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni, kde diferencují na několik typů. Diferenciace a dělení dále pokračuje ve dvou liniích, a to linií myeloidní a lymfoidní (Hořejší, 2013). Všechny buňky z myeloidní linie patří k nespecifickým imunitním mechanismům. V této linii vznikají monocyty, které se v krvi diferencují na makrofágy, dendritické buňky a tři druhy granulocytů (Auffray et al., 2009). Granulocyty se podle afinity svých granulí ke kyselým nebo zásaditým barvivům klasifikují na bazofily, eozinofily a neutrální neutrofilny (Reece, 2009). Z lymfoidní linie se pak diferencují NK buňky a lymfocyty. Některé z lymfocytů, jež se dělí na B a T, se po setkání s antigenem diferencují v paměťové (efektorové) buňky. A při opětovné interakci se stejným antigenem způsobují sekundární anamnestickou odpověď (Hořejší, 2013). Leukocyty uvnitř mléčné žlázy poskytují jistý stupeň buněčné ochrany díky již zmiňované schopnosti rozeznávat patogeny. Také indukují prozánětlivé procesy. Mají také schopnost fagocytózy a uvolňují chemoatraktanty, antimikrobiální proteiny a peptidy (Kehrli et Shuster, 1994).

Ze somatických buněk v mléce představují leukocyty až 75%. Z toho polymorfonukleární leukocyty (granulocyty) zastupují 10-30 %, makrofágy 60-70 % a lymfocyty 20-30 % (Kelly et al., 2000). Během zasažení vemene infekcí může podíl leukocytů vystoupat až na 95 % všech SC a dochází také ke změnám v zastoupení jednotlivých druhů. Dramaticky se mění podíl granulocytů, který může dosáhnout až 90-95 % zastoupení mezi leukocyty. Naopak podíly makrofágů a lymfocytů klesají (Ezzat Alnakip et al., 2014).

3.4.3 Neutrofilny

Neutrofilny představují až 60 % leukocytů cirkulujících v krevním oběhu (Newsholme et al., 1999). Zastupují významnou roli v imunitní odpovědi hostitele proti bakteriální infekci. Jejich úlohami v imunitní odpovědi je uvolňování obsahu svých granulí a fagocytózou patogeních mikroorganismů nebo nekrotické tkáně (Wright et al., 2010; Mócsai, 2013; Havixbeck et al., 2016). Řada enzymů a látek obsažených v granulích neutrofilů může účinně eliminovat rozdílné patogeny mastitid. Bohužel tyto mechanismy postrádají specifitu, a tak může docházet k fagocytóze tukových částic v mléce. Případně některé z takto uvolněných oxidantů a proteáz mohou degradovat mléčný kasein, což má dopad na kvalitu mléka. Společně s uvolněnými hydroxylovými radikály mohou enzymy neutrofilů poškozovat epitelny mléčné

žlázy a snižovat tak jejich sekreční aktivitu (Prin-Mathieu et al., 2002). Bez přítomnosti prozánětlivých aktivačních činidel nebo po splnění svých úkolů podstupují zralé neutrofilové apoptózu a nechávají se pohltit makrofágy, čímž předcházejí uvolnění jejich cytotoxického obsahu do extracelulárního prostředí (Savill, 1989).

U skotu se polymorfní neutrofilové vyskytují i ve zdravém vemeni (Paape et Guidry, 1969). Bylo prokázáno, že bez přítomnosti zánětu prostupují epitelem mléčné žlázy bez jeho odlupování (Lin et Xia, 1995). Uvádí se, že jen malá část neutrofilů je uložena v kostní dřeni, zatímco početnější část nezralých neutrofilů cirkuluje krevním oběhem, důsledkem toho je rychlá mobilizace během zánětlivého procesu (Waller, 2002).

Je známo, že chemotaktická migrace buněk je zprostředkována některými cytokiny, např. IL-2, IL-6 a IL-8 (Moussaoui et Vangroenweghe, 2004). Expozice neutrofilů cytokinům prostřednictvím receptorů vede k jejich rapidní mobilizaci (Moussaoui et al., 2002). V plazmatické membráně neutrofilů je situováno několik funkčně důležitých receptorů, zahrnujících adhezní molekuly a membránové receptory pro některé imunoglobuliny, důležité při fagocytóze mikroorganismů. Tyto receptorové struktury mají bílkovinnou povahu, jejich řetězce jsou často složeny z 2 nebo 3 odlišných podjednotek (též smyček). K hlavním charakteristikám receptorů patří jejich afinita, tedy schopnost vázat na sebe ligandy. Každá podjednotka receptoru se vyznačuje určitou afinitou. Spojením dvou a více podjednotek výrazně roste afinita celého komplexu a zvyšuje se také intenzita celé případné interakce receptor – ligand. Úplný receptor tak zachytí ligand velmi pevně a je jím také účinněji stimulován (Jílek, 2014).

3.4.4 Chemotaxe

Pro zánětlivou reakci je typický pohyb buněčných elementů imunitní soustavy i dalších systémů. K tomu je potřeba příslušný podnět na receptorech imunocytů, které mají migrovat. Podnětem nebo také ligandem bývají chemoatraktivní látky endogenního i exogenního původu (Krejsek et Kopecký, 2004b). Tyto látky zprostředkovávají aktuální potřeby organismu v akumulaci potřebných buněčných elementů v místě zánětu. Usměrněný pohyb buněk i následná sekrece protilátek jsou zapříčiněny změnami adhezních vlastností buněk imunitního systému a dalších buněčných elementů (Li Jeon et al., 2002; Widdison et al., 2011). Migrace buněk imunitního systému v průběhu zánětu a deskvamace epitelů v důsledku mastitid se projevuje zvýšením obsahu somatických buněk v mléce (Harmon, 1994; Bradley et Green, 2005).

3.4.5 Cytokiny

Cytokiny jsou rozmanitou skupinou látek bílkovinného charakteru a malé velikosti (méně než 50 kDa) (Belardelli, 2002). Jsou si podobné s peptidovými hormony, ale liší se rozsahem působení. Jejich název se skládá ze slov cyto "buňka" a kines "pohyb", a vyjadřuje jejich funkční povahu (Lackie, 2010).

Do skupiny cytokinů patří chemokininy, interferony, interleukiny, lymfokiny a tumor nekrotizující faktory, transformující růstové faktory, faktory stimulující kolonie a další (Ferenčík, 2005; Lackie, 2010). Jedná se o signální molekuly a jejich úkolem tedy je zprostředkování komunikační interakce nejen v průběhu zánětu, ale i během krvetvorby, stresu, imunitních, reparačních a regulačních procesech obecně (Lackie, 2010). K uvolňování cytokinů dochází z mnoha buněčných skupin. Převažujícími producenty jsou pomocné T lymfocyty a makrofágy. Cytokiny mohou být uvolňovány také v periferní nervové tkáni při fyziologických a patologických procesech, buňkami žírnými, endotelovými a Schwannovými buňkami (Xie et al., 2006). Účinek cytokinů je pleiotropní, což znamená, že jeden cytokin může regulovat širší spektrum biologických dějů (Paul, 1989).

Z rodiny cytokinů je za hlavní chemoatraktant imunocytů během mastitid považován interleukin 8 (IL-8, také CXCL8) (Barber, 1999). Byla prokázána jeho úloha při aktivaci a směřování neutrofilů do infikované mléčné žlázy skotu (Lahouassa et al., 2008; Galligan et al., 2000). Je označován jako hlavní indikátor chemotaxe (Zlotnik et al., 1999), kterou in vitro potvrzuje také Watanabe et al. (2008). Klíčová role IL-8 je dále potvrzena při imunitních procesech během infekcí vemene *Stafylokoky* a *Escherichiiemi* (Persson Waller et al., 2003.)

3.4.6 CXCR1

Chemokinový receptor CXCR1 je struktura bílkovinného charakteru na povrchu neutrofilů (Proudfoot, 2002). Zastává v imunitní reakci během mastitid důležitou roli, protože je vysoce afinitní vůči cytokinu interleukinu 8 (IL8) (Lahouassa et al., 2008), který je v průběhu infekce epiteliálními buňkami uvolňován makrofágy, endoteliálními a epiteliálními buňkami, fibroblasty a dalšími buňkami v reakci na invazi patogenů nebo na stres (Bobrovnikova-Marjon, 2004). Chemokinový receptor 1 pro IL-8 byl popsán také na NK buňkách, CD4+ T, CD8+ T buňkách a dendritických buňkách (Berahovich, 2006; Takata et al., 2012; Gasser, 2006)

Stimulace CXCR1 interleukinem 8 zapříčiňuje interakci s G-proteinem a vápníkovou signalizaci, migraci, mikrobicidní fagocytózu nebo případnou apoptózu neutrofilů a regulaci další chemotaxe (Baggiolini et al., 1992). Ve vztahu k oxidativnímu stresu vazba IL-8 s CXCR1 podporuje generování reaktivního kyslíku (DeForge, et al., 1993). Současné studie na skotu potvrzují také zvýšené uvolňování IL-8 během zánětlivých procesů (Pawlik et al., 2015). V humánní imunologii je zkoumán jeho význam během růstu metastáz (Fulmer, 2010) nebo u rozvoje onemocnění AIDS (Proudfoot, 2002). Gen pro receptor CXCR1 skotu se nachází na chromozomu 2 a kóduje protein o délce 360ti aminokyselin (Verbeke et al., 2015). Na tomto genu jsou popsány četné polymorfismy, které jsou předmětem studií na různých plemenech skotu (Heaton et al., 2001; Youngerman et al., 2004; Beecher et al., 2010).

3.4.7 Polymorfismus CXCR1

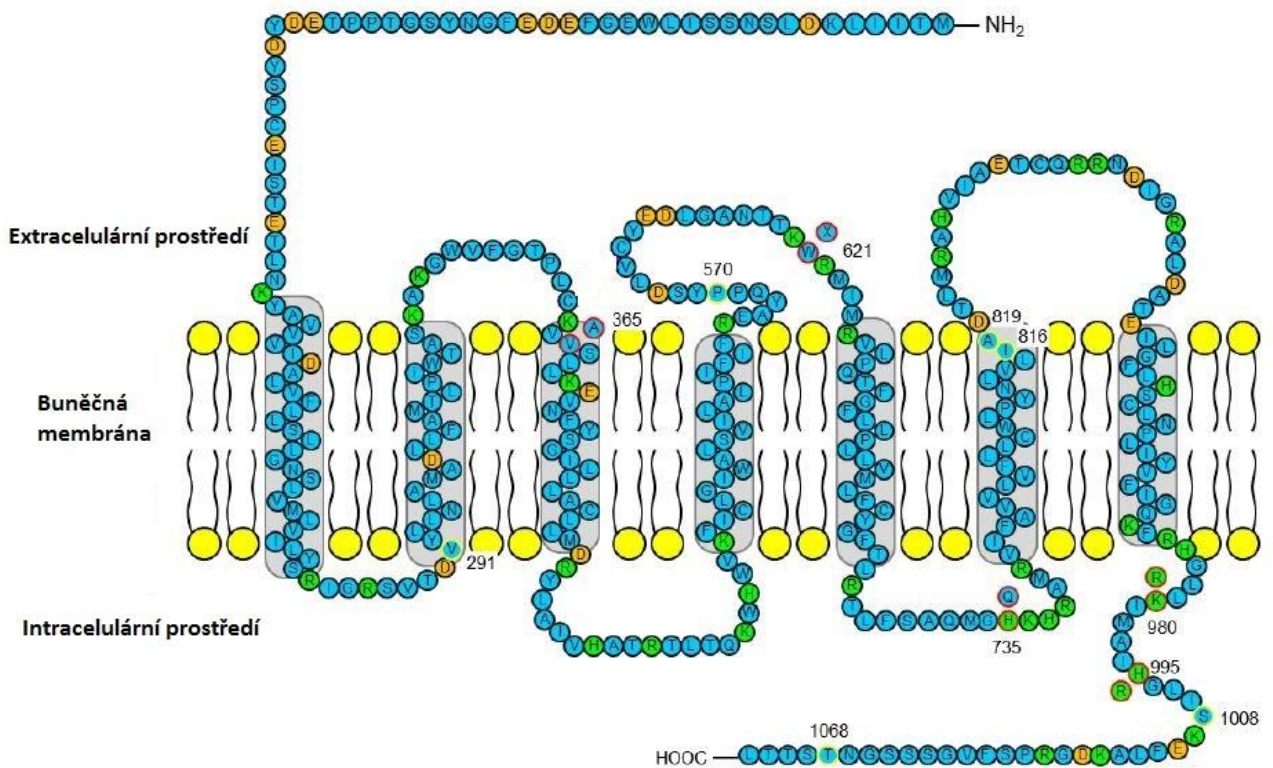
Polymorfismus dědičné informace je široké označení pro geneticky podmíněný výskyt téhož znaku aspoň ve dvou, případně více formách (Řehout et al., 2003). Jednonukleotidový polymorfismus (SNP - single nucleotide polymorphism) je mutace v genetické informaci, která vzniká změnou jediného páru nukleotidů v sekvenci genu, které může zapříčinit změnu aminokyseliny v peptidu a také funkční změny (Snustad et Simmons, 2009). Nejčastěji se jedná o inserce nebo delece nukleotidů. Ne všechny takové změny se musí promítat do fenotypu jedince. Uvádí se až stonásobně častější výskyt polymorfismu v nekódujících oblastech genu (Řehout et al., 2003).

Vztahu mezi takovými změnami v genu *CXCR1* a jejich fenotypovým projevem ve zdraví a užitkovosti skotu je věnována značná pozornost (Goertz et al., 2009; Beecher et al., 2010; Galvão et al., 2011; Pokorska et al., 2016). Studie popisují četné polymorfismy v kódující i nekódující oblasti tohoto genu. Pighetti (2012) ve své studii popisuje čtyři SNP, které jsou příčinou substituce aminokyselin a jeden SNP označuje jako důvod časného stopkodonu. Youngerman et al., (2014) ve své studii popisuje 8 SNP v kódující oblasti *CXCR1*. A Verbeke (2015) uvádí, že jen v kódující oblasti *CXCR1* se nachází 16 SNP, přičemž 6 z nich popsal nově.

Předmětem již několika studií byl SNP v oblasti 735 C/G, také označované *CXCR1 + 777 G/C* právě ve vztahu k mléčné užitkovosti, počtu somatických buněk a k subklinickým mastitidám. Tento SNP je lokalizován v kódující oblasti pro třetí intracelulární smyčku receptoru, což je oblast velmi důležitá pro aktivaci G proteinu. Vlivem mutace na *CXCR1 + 777 G/C* dochází k záměně aminokyselin histidinu za glutamin, čímž

může být ovlivněna aktivita receptoru při vazbě ligandu a následná interakce s G-proteinem. Toto má dopad na celou kaskádovitou signalizační reakci v buňce a její roli v imunitní odpovědi (Rambeaud et Pighetti, 2005). Výzkumem in vitro je podložen vliv polymorfismu *CXCR1* + 777 G/C na životnost a migraci polymorfních neutrofilů skotu v krvi jako odpověď na stimulaci IL-8 (Pighetti et al, 2012). Studie na holštýnském a jerseykém skotu naznačují vyšší úroveň dojivosti krav s genotypem +777 CC. Naopak s ohledem na nižší výskyt subklinických mastitid a počet somatických buněk v mléce jsou zvýhodněny dojnice s genotypem GG uvedeného polymorfismu (Youngerman et al., 2004). Asociaci mezi tímto SNP a počtem somatických buněk potvrdili i další autoři ve studiích na holštýnsko-fríských kravách (Beecher et al., 2010; Galvão et al., 2011). Je také popsáno snížení vápníkové signalizace, jako jednoho z mechanismů imunologické reakce, u krav s genotypem 735 CC (Rambeaud et Pighetti, 2006).

Obrázek č. 1: Struktura chemokinového receptoru *CXCR1* na povrchu neutrofilu (Verbeke, 2015). Číselně jsou označeny lokusy některých polymorfismů.



3.5 Genomika

Tradiční metody šlechtění jsou založeny na populační genetice a statistických postupech. Genetický pokrok tedy vychází ze selekce zvířat dle fenotypových vlastností a odhadu plemenné hodnoty, bez znalosti jejich genetické podmíněnosti. Takové postupy se ale špatně uplatňují při šlechtění na obtížně měřitelné znaky nebo na znaky s nízkou heritabilitou a predikce tak mohou být nepřesné (Montaldo et Meza-Herrera, 1998; Beuzen et al., 2000). Přesto bylo konvenčními metodami šlechtění již dosaženo značného genetického pokroku (Navajas, 2014). Současnost však přeje metodám molekulární genetiky, které umožňují zkoumat sledované znaky na úrovni DNA a nabízejí podnětné informace k přímé selekci na základě identifikace konkrétního major genu (s přímým účinkem) pro kvantitativní znak, lokusu pro tento kvantitativní znak (QTL-quantitative trait loci) nebo podle genetického markeru spojeného s QTL. Tyto skutečnosti dávají vznik genomice, jako specializovanému oboru, usilujícímu o komplexní analýzu dědičné informace organismu.

Základem je tedy celogenomové stanovení oblastí, kódujících QTL, kterými se rozumí soubor genů s přímým vlivem na fenotyp (Hayes et Goddard, 2001). Protože tyto geny nemusí být snadno detekovatelné, využívá genomika SNP markery v blízkosti QTL nebo jiné části a sekvence DNA ve vazbě k těmto genům (Beuzen et al., 2000). Prostřednictvím metod molekulární genetiky je popisován polymorfismus v specifických oblastech genetické informace i mezi jedinci v populaci. Díky lokalizaci těchto polymorfismů a genetických markerů vznikají genetické mapy, které pomáhají odhalovat a charakterizovat úseky působnosti QTL pro účely šlechtění (Montaldo et Meza-Herrera, 1998). Mezi metodami genotypizace mají velký potenciál čipy (microarrays), s jejichž pomocí je možné získat množství informací o užitkových vlastnostech v řádu tisíců během jednoho testu (Smith et Rosa, 2007).

Významným pokrokem je stanovení a lokalizace oblastí genů pro ekonomicky důležité znaky v živočišné produkci. Informace o takových QTL nejen skotu ale i ovcí, prasat a kuřat jsou shromažďovány a zpřístupněny v online databázích (AnimalGenome, 2003; Navajas, 2014). Již bylo popsáno několik QTL ve vztahu k mastitidě. Není překvapením, že se jedná jak o geny pro imunitní schopnosti, tak pro mléčnou užitkovost, neboť mezi odolností mléčné žlázy vůči zánětu a produkcí mléka je prokázán antagonistický vztah (Ogorevc et al., 2009; Rupp et Boichard, 2003).

3.5.1 Markery asistovaná selekce

Vhodným nástrojem ve šlechtění skotu pro zlepšení zdraví vemene a doживosti je markery asistovaná selekce (MAS). Jedná se o selekční postup založený na identifikaci lokusů kvantitativních vlastností místo sledování fenotypového projevu (Ribaut et Ragot, 2006).

Převažující část užitkových a funkčních vlastností dojeného skotu se řadí mezi komplexní vlastnosti, čili je polygenetického založení. Geny, které mají podíl na projevu ekonomicky nejdůležitějších znaků, jsou rozmístěny po celém genomu. Takových genů, které ovlivňují požadované znaky s velkým účinkem je tedy málo, ale naopak existuje značné množství genů s menší vlivem (Thallman, 2009).

Principem MAS je zpracování informací DNA u kvantitativních znaků, se zaměřením na QTL nebo na DNA markery, které jsou s nimi alespoň v co nejužší vazbě. MAS se tedy soustředí na selekci genů, které prokazatelně ovlivňují vybrané užitkové vlastnosti. Tyto markery mohou být buď ve vazbě s vybraným QTL a nebo samotný QTL může být použit jako marker (Collard et al., 2005). Pokud dojde u jedince k identifikaci markeru v asociaci s QTL, lze jej zapojit do selekčního programu. Pro úspěšnou realizaci markery podporované selekce je potřeba identifikace specifických polymorfismů, které jsou zodpovědné za pozorovaný účinek. Dnes probíhá identifikace genů a dokonce i konkrétních polymorfních alel, které generují QTL. (Ron et Weller, 2007). Běžně se pro účely MAS a tvorbu genových map využívaly mikrosatelitní sekvence (Řehout et al., 2003). Barabaschi et al. (2016) popisuje současnou tendenci k využívání SNP markerů.

Účinnost MAS již byla potvrzena množstvím studií. Genetické zisky jsou díky MAS podle některých autorů až o 10 - 20% vyšší (Wakchaure et Ganguly, 2015), zatímco jiní odhadují zvýšení genetického zisku od 2 % až do 30 % (Řehout et al., 2003). Kombinací molekulárních analýz a konvenčních metod šlechtění vzniká odhad genomické plemenné hodnoty, která se již úspěšně uplatňuje při šlechtění dojeného skotu. Díky takovým postupům lze očekávat zpřesnění odhadu plemenných hodnot a snižování nákladů na nákladů na genetický zisk.

Výhodou MAS i genomiky je snadné zjištění genotypu zvířete, rychlost a možnost realizace analýz v kterékoliv etapě života zvířete. Díky takto získaným datům lze vybírat rodiče následující generace ještě před jejich zařazením do testace, případně do plemenitby. Tím se redukuje část nákladů a zároveň to činí MAS účinnější pro genetický pokrok než tradiční metody šlechtění. MAS je přínosem hlavně ve šlechtění na znaky, jejichž měření je nákladné,

vyznačují se nízkou dědivostí nebo jsou významně ovlivněny vnějšími podmínkami (Montaldo et al., 1998). Typickým příkladem takového navíc ekonomicky důležitého znaku, významně podléhajícího efektům prostředí, může být právě dojivost a s ní související zdraví vemene. Užitečným markerem pro šlechtění a genetický pokrok v těchto znacích by mohl být i polymorfismus *CXCR1* +777 C/G s ohledem na výsledky některých studií (Youngerman et al., 2004; Beecher et al., 2010; Galvão et al. 2011) a jeho genomovou polohu (90,3 cM), blízko QTL pro SCC (91,5 cM) (Bennewitz et al., 2003; Rambeaud et Pighetti, 2006).

4 Materiál a metodika

Pozorování probíhalo na 298 kravách českého strakatého skotu, které byly potomky 28 býků. Krávy pocházely ze čtyř farem a byly narozeny v letech 2001 - 2007. Telily se v letech 2009 – 2011. Vstupními údaji pro výpočty byla data, vyplývající z kontroly užitkovoti, zjištěná z databáze Plemdat. Do studia byly zahrnuty informace o dojivosti a výskytu SC z prvních tří laktací. Jednalo se o údaje o dojivosti skórovaném počtu somatických buněk za jednotlivé laktace (LSCS). Základní statistiky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka č.1 Přehled základních statistik souboru v závislosti na pořadí laktace (Statistica 12, Statsoft)

Období	Průměrná dojivost	Sm.odch.	Sm.chyba	LSCS	Sm.odch. LSCS
1 laktace	7318,0	1951,5	111,1	0,9	1,7
2 laktace	8032,3	2095,1	120,4	1,1	1,8
3 laktace	7434,0	3082,2	188,3	1,2	2,1

4.1 Izolace DNA a genotypování

Vzorky DNA byly získány z plné krve, odebrané veterinárním lékařem z ocasní žíly a ošetřeny kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Jedná se o polyaminokarboxylovou kyselinu, která se běžně používá k zabránění vzniku sraženin *in vitro* přidáním do sběrných zkumavek (Banfi et al., 2007). EDTA patří mezi chelatační činidla, inhibuje degradaci DNA tím, že vyvazuje z roztoku dvojmocné kationty, jež jsou důležité pro působení deoxiribonukleázových enzymů (Barra et al., 2015). Izolace DNA pak probíhala na automatickém izolátoru nukleových kyselin PrepStation ABI 6100, Applied Biosystems, dle protokolu výrobce. Vzorky DNA byly uskladněny v chladicím boxu.

Předmětem pozorování byl bodový polymorfismus genu *CXCR1* na exonu 1, v oblasti +777 G/C, rs 208795699. Genotypování probíhalo metodou polymerázové řetězové reakce a štěpení restričních fragmentů (PCR-RFLP). Polymerázová řetězová reakce je cyklický třístupňový proces, jehož výsledkem je vysoké množství kopií konkrétní sekvence DNA. Principem je schopnost denaturace dvouvláknové šroubovice nukleové kyseliny za vysokých teplot a její následná renaturace při zachování pravidla komplementarity bazí. V prvním kroku PCR dochází zahřátím k rozvolnění vodíkových můstků spojujících vzájemně komplementární purinové a pyrimidinové báze, čímž jsou od sebe oddělovány jednotlivé řetězce DNA. Výsledkem tohoto procesu je jednořetězcová DNA, která je dále hybridizována s nabytkem primerů za působení nižších teplot. Následně je použitím DNA-polymerázy replikována sekvence DNA mezi hybridizovanými primery. Produkt replikace je opět cyklicky vystaven všem popsaným krokům PCR až do dosažení požadovaného množství DNA (Snustad et Simmons, 2009).

Vlastní PCR amplifikace probíhala v termocykleru EAST PORT PRIMUS. Přesné složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 2. Pro PCR reakci byl použit MgCl₂, (TopBio), jedná se o premix Taq polymerázy, pufru, MgCl₂ a nukleotidů, tedy komponent nezbytných pro průběh PCR.

Použité primery (Genery Biotech, ČR) byly navrženy dle dostupné literatury, stejně tak i teplotní profil provedené reakce vycházel z dokumentace (Goertz, 2009) a je uveden v tabulce č. 3. Pro podmínky naší laboratoře byl teplotní profil optimalizován zkouškou teplotního gradientu pro nalezení optimální alenační teploty. Velikost cílového PCR produktu byla 265 bp.

Tabulka č.2 Složení PCR reakční směsi

Komponenta	Množství
DNA	50-100ng/1μl
H ₂ O	2,2 μl
PPP Master Mix	5 μl
Primer CXCR1_F = 5'-GAGGCCTATCAACCACCGTA-3'	0,4 μl
Primer CXCR1_R = 5'-GCGATCAGGACCAGGTTGTA-3'	0,4 μl
Celkový reakční objem	10 μl

Tabulka č.3 Teplotní profil PCR reakce

Operace	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	4 min	1
Denaturace	94 °C	30 s	35
Anelace	61 °C	20 s	35
Elongace	72 °C	30 s	35
Závěrečná elongace	72 °C	5 min	1

Získané PCR produkty byly dále štěpeny specifickým restrikním enzymem. Restrikní štěpení je založeno na detekci specifické (většinou palindromatické) sekvence DNA restriktázou, která katalyzuje štěpení. Tím byly získány fragmenty definované délky, které byly následně separovány elektroforézou. Rozdíly ve velikostech štěpných fragmentů jsou zapříčiněny rozdílným genotypem.

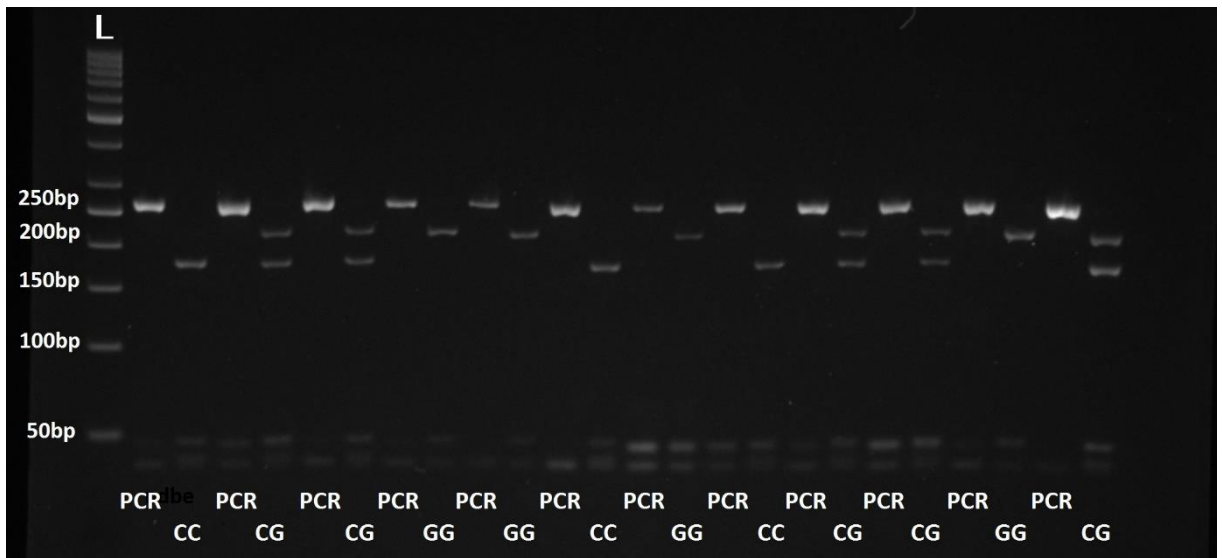
Pro vlastní štěpení byla použita restriktáza *Sdu1* (*Bsp1286I*) a příslušný pufr *Sdu1* (Thermo SCIENTIFIC). Inkubace probíhala přes noc v termostatu za teploty 37° C. Přesné složení restrikní směsi je uvedeno v tabulce č. 4. Schémata štěpení *Sdu1* restriktázou jsou vizualizována pomocí programu CLC Sequence viewer 7 na obrázcích 3 a 4 v příloze.

Tabulka č.4 Přehled komponent restrikního štěpení

Komponenta	Množství
PCR produkt	4 µl
Restriktáza <i>Sdu1</i>	0,5 µl
Pufr <i>Sdu1</i>	0,8 µl
H ₂ O	3,7 µl

Separace restrikních fragmentů probíhala na 3,5% agarózovém gelu (SeaKem LE Lonza, Švýcarsko), v 1 molárním roztoku TBE, na elektroforéze Liberty po dobu 35 minut. Pro měření délky fragmentů byl použit marker O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas). Na agarózový gel byl vždy nanesen vzorek PCR produktu a vedle něj příslušný vzorek restrikního štěpení. Vzorky byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu (5 µl /100ml gelu) ve fluorescenčním vizualizačním systému G:box SynGene USA (Obrázek 2).

Obrázek č. 2 Vizualizace produktů PCR – RFLP ve fluorescenčním vizualizačním systému: L – marker 50 bp, PCR - kontrola produktu PCR; následující band (CC,CG nebo GG) je fragment rozdílné délky podle genotypu po restričním štěpění



Na základě dostupné literatury byly stanoveny genotypy dle velikosti restričních fragmentů. Velikost fragmentů pro genotyp *CC* byla 182bp a 45bp, pro *CG* 221bp a 182bp, a pro *GG* 221bp a 45bp (Leyva-Baca et al., 2008).

4.2 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení byla použita procedura GLM s modelem zahrnujícím pevné efekty genotypu, farmy, věku při prvním otelení a otce dojnice. Dále pak Tukey- Kramerův test pro vyhodnocení vlivu jednotlivých efektů, které byly vyhodnoceny jako průkazné. Statistické zpracování proběhlo ve statistickém počítačovém programu SAS (9.4. Institute). Hardy-Weinbergova rovnováha byla staovena ručním výpočtem.

Následující modelová rovnice pro proceduru GLM byla použita pro vyhodnocení závislosti mezi pozorovanou dojivostí za první tři laktace.

1. Modelová rovnice pro hodnocení dojivosti za laktaci

$$y_{ijklm} = a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + g_n + e_{ijklm}$$

kde:

y_{ijklm} - dojivost za laktaci v kg

a_i - fixní efekt chovu ($i = 1 - 4$)

b_j - fixní efekt roku prvního otelení ($j = 1 - 8$)

c_k - fixní efekt pořadí laktace ($k = 1 - 3$)

d_l - fixní efekt otce ($l = 1 - 28$)

f_m - fixní efekt genotypu ($m = 1 - 3$)

g_n - fixní efekt sezóna a rok kontroly užítkovosti ($n = 1 - 4$)

e_{ijklm} - náhodná reziduální chyba

Následující modelová rovnice byla použita pro vyhodnocení závislosti mezi pozorovaným skóre somatických buněk za první tři laktace.

2. Modelová rovnice pro hodnocení výskytu somatických buněk za laktaci

$$y_{ijklmn} = a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + g_n + e_{ijklmn}$$

kde:

y_{ijklmn} - skórovaný počet somatických buněk za laktaci

a_i - fixní efekt chovu ($i = 1 - 4$)

b_j - fixní efekt roku prvního otelení ($j = 1 - 8$)

c_k - fixní efekt pořadí laktace ($k = 1 - 3$)

d_l - efekt otce ($l = 1 - 28$)

f_m - fixní efekt genu ($m = 1 - 3$)

g_n - fixní efekt sezóna a rok kontroly užítkovosti ($n = 1 - 4$)

e_{ijklmn} - náhodná reziduální chyba

5 Výsledky

5.1 Základní statistiky

Celkem bylo pozorováno 298 dojnic během prvních tří laktací. Na první laktaci dosáhly nejvyšší dojivosti krávy s genotypem *GG*, na druhé laktaci heterozygoti *CG* a na třetí laktaci krávy s genotypem *CC*. Nejnižší průměrný stav somatických buněk byl zaznamenán u dojnic s genotypem *GG* během všech tří laktací.

5.2 Hardy-Weinbergova rovnováha

Do pozorování bylo zahrnuto 298 dojnic českého strakatého skotu. Ze získaných údajů byly zjištěny genové a genotypové frekvence. U genu *CXCR1* se v oblasti + 777 vyskytovala mutovaná alela *C* s frekvencí 0,64 a nemutovaná alela *G* s frekvencí 0,36. Vypočtením Hardy-Weinbergovy rovnováhy bylo zjištěno, že populace se nachází v genetické rovnováze. ($\chi^2 = 0,404$).

Tabulka č.5 Frekvence genotypů pro *CXCR1*

Polymorfismus	Genotypové frekvence
<i>CXCR1</i> + 777 <i>C/G</i>	<i>CC</i> = 0,13
	<i>CG</i> = 0,46
	<i>GG</i> = 0,41

Tabulka č.6 Frekvence alel pro *CXCR1*

Polymorfismus	Genové frekvence
<i>CXCR1</i> + 777 <i>C/G</i>	<i>C</i> = 0,36
	<i>G</i> = 0,64

5.3 Vliv genotypu na dojivost

Procedurou GLM (SAS 9.4) bylo zjištěno, že průkazný vliv ($P < 0,001$) na dojivost zkoumaného souboru krav má chov a genetické založení plemenného býka, otce dojnice (tabulka 7). Nejvyšší dojivost byla pozorována u genotypu *CC* na první laktaci, na druhé laktaci u genotypu *CG* a na třetí laktaci u genotypu *GG*. Přehled dojivosti za jednotlivé laktace podle genotypů je uveden v tabulce 8.

Tukey-Kramerovým testem byla zjištěna nejnižší dojivost ve čtvrtém chovu. Přehled dojivosti na jednotlivých farmách je znázorněn v grafu 2 a tabulce 12 v příloze.

Tabulka 7: Přehled statisticky významných efektů pro dojivost

Efekt	1. laktace Pr > F1	2. laktace Pr > F2	3. laktace Pr > F3
Farma/chov	<0,001	<0,001	<0,001
Otec	<0,001	<0,001	<0,001
Období KU	0,7125	<0,001	0,0002

Tabulka 8: Přehled průměrné dojivosti podle genotypů během jednotlivých laktací

Genotyp	Dojivost za 1. laktaci LSM	Dojivost za 2. laktaci LSM	Dojivost za 3. laktaci LSM
CC	7390,0	7841,3	7354,9
CG	6950,5	7933,7	7104,3
GG	7219,5	7921,1	7386,8

5.4 Vliv genotypu na skóre somatických buněk

Na základě výpočtů prostřednictvím GLM (SAS 9.4) byly jako statisticky průkazné vlivy zjištěny opět efekt chovu, efekt otce a na rozdíl od dojivosti také efekt věku (tabulka 9). Přehled skórovaného výskytu somatických buněk, stanoveného prostřednictvím metody LSM, je uveden v tabulce 10. Nejnižší výskyt SC je zaznamenán u genotypu *CC* na první laktaci, na druhé a třetí laktaci u genotypu *GG*.

Z hodnocení Tukey-Kramerovým testem vyšla nejhůře farma číslo 4, přehled skórovaného výskytu SC za jednotlivé laktace je uveden v příloze (tabulka 11). Přehled dojivosti a výskytu SC podle otců krav je také uveden v příloze (tabulka 13)

Tabulka 9: Přehled statisticky významných efektů pro skóre výskytu somatických buněk v mléce

Efekt	1. laktace Pr > F	2. laktace Pr > F	3. laktace Pr > F
Farma/chov	<0,001	<0,001	<0,001
Otec	<0,001	<0,001	0,1346
Rok otelení	<0,001	<0,001	<0,001

Tabulka 10: Výskyt somatických buněk (SCS) podle genotypů během jednotlivých laktací

Genotyp	SCS za 1. laktaci LSM	SCS pro 2. laktaci LSM	SCS pro 3. laktaci LSM
CC	0,7	1,0	2,1
CG	0,9	1,2	2,0
GG	0,9	0,9	2,0

6 Diskuze

6.1 Hardy-Weinbergova rovnováha

Frekvence výskytu jednotlivých alel se odvíjí podle šlechtitelského cíle a sledovaného plemene. Výskyt jednotlivých genotypů se tak právě díky šlechtění, může různě lišit i mezi jednotlivými stády. Během studie Goertz et al. (2009) na holštýnském skotu v Německém chovu byl pozorován výskyt alely $G=0,47$, což odpovídá výsledkům Leyva-Baca et al., (2008) na holštýnském skotu chovaném v Kanadě, uvádějícím výskyt alely $G = 0,46$. Další studie na amerických holštýnech ale popisuje vyšší výskyt alely $G = 0,57$ (Galvão, et al., 2011). Nejvyšší frekvenci alely $G = 0,87$ uvádí Youngerman et al., (2004) u jerseykého skotu. Výskyt alely G v tomto pozorování na českém strakatém skotu odpovídá $0,64$ a je totožný s výsledky Zhang et al. (2012) u čínského holštýnského skotu. Pozorovaná skupina čínského holštýnského skotu čítala na 400 krav a pozorování na českém strakatém skotu probíhalo na 298 dojnicích, zatímco ostatní uvedené studie probíhaly na skupinách skotu v rozmezí 24 až 88 kusů. Vyšší frekvence alely G tedy může souviset s širším rozsahem sledování, jak také uvádí Zhang et al.,(2012).

Nejméně početným genotypem v tomto pozorování je $CC = 0,13$ a nejpočetnější $CG = 0,46$. Svou četností se však příliš neliší od genotypu $GG = 0,41$. Piggheti et al., (2010) uvádí genotypovou frekvenci GG u holštýnského skotu v Tennessee $0,25$, která je ekvivalentní k výsledkům Beecher et al.,(2010) u plemene montbeliard. Vedle toho Beecher ve své studii na Irských chovech popisuje meziplemenné rozdíly genotypových frekvencí $GG = 0,38$ pro holštýnský skot, $GG = 0,62$ pro jersey a $GG = 0,37$ u jejich kříženců. V americkém stádě holštýnského skotu Leyva-Baca et al.,(2008) uvádí genotypovou frekvenci $GG = 0,18$. Výskyt genotypu GG v pozorování na českém strakatém skotu tak odpovídá průměrnému výskytu genotypu GG u holštýnských krav.

6.2 Vliv genotypu na dojivost

Ačkoliv například Galvão et al., (2011) ve své studii uvádí průkazný vztah mezi genotypem *CXCR1 + 777 CG* a vyšší dojivostí u holštýnského skotu a Beecher et al., (2010) naznačuje asociaci výskytu alely G s nižší dojivostí, toto současné pozorování neprokázalo vztah mezi úrovní dojivosti a polymorfismem *CXCR1 + 777 CG*. Výsledky současného pozorování jsou ale v souladu se studií Zhang et al., (2012) na čínském holštýnském skotu. Zhang et al., (2012) během svého pozorování neprokázal vztah mezi tímto polymorfismem, dojivostí ani obsahem některé z mléčných složek. Také výsledky studie Leyva-Baca et al., (2007) neprokazují vliv *CXCR1 + 777 C/G* na dojivost, ale uvádí pozitivní asociaci alely C s hloubkou vemene, která je jednou z kapacitních charakteristik vemene, a tak i jedním z předpokladů pro dobrou a dlouhodobou mléčnou užitkovost dojnic (Patel et al., 2016).

Na úrovni dojivosti skotu se vedle genetického založení krav podílí i další různé faktory. Jedná se o věk dojnic, fázi laktace ale i vnější vlivy zahrnující, mikroklima stáje, technologie a management chovu (Bittante et al., 2015). Mléčná produkce a kvalita mléka jsou pak ovlivňovány především úrovní výživy (Eastridge et al., 2006; Daniel et al., 2016) dále také fází laktace, pravidelností a počtem dojení (Zhang et al., 2016). Je například známo, že krávy dojené dvakrát a vícekrát denně mají celkově vyšší dojivost (Bernier-Dodier et al., 2010). Statistické vyhodnocení údajů současného pozorování poukazuje na vliv chovu na dojivost krav. Konkrétní podmínky a způsob chovu jednotlivých farem nebyly součástí tohoto honocení. Vzhledem k výraznému propadu úrovně dojivosti jednoho z pozorovaných chovů oproti ostatním lze usoudit, že tento chov (farma č. 4) nevyužívá genetického potenciálu svých zvířat.

Genetická korelace mezi klinickou mastitidou a mléčnou užitkovostí je v literatuře uváděna v rozmezí 0,26 – 0,45 (De Haas, et al., 2008). Je také znám vztah mezi poklesem mléčné užitkovosti a stoupajícím výskytem SC (Harmon, 1994; Schallibaum, 2001). Bobbo et al., (2016) pozoroval vztah mezi SCS a dojivostí. Ve své studii uvádí pokles denní dojivosti o 0,18 kg mléka při zvýšení SCS o celý jeden stupeň, což se dále mění v rozmezí hodnot SCS 2 až 5, během něhož klesá denní dojivost i o 0,5kg. Další studie uvádí pokles denní dojivosti až o 1,1kg při zvýšení o stupeň SCS (De los Campos et al., 2006). Jamrozik et al., (2010) popisuje taktéž negativní korelaci mezi SCS a dojivostí na první a třetí laktaci, ale na druhé laktaci uvádí nízký pozitivní reciprokový vztah mezi SCS a mléčnou užitkovostí. Jestliže tedy výsledky některých studií naznačují vztah alely G k nižší dojivosti, nabízí se také předpoklad její asociace k vyššímu výskytu SC.

6.3 Vliv genotypu na zdraví vemene

Jak již bylo zmíněno, úroveň zdraví mléčné žlázy bývá charakterizována počtem somatických buněk v mléce, které jsou zastoupeny převážně leukocyty a neutrofilů. Je známa studie polymorfismu *CXCR1 + 777 C/G*, která se zabývá vztahem jednotlivých genotypů a funkčních vlastností neutrofilů v průběhu zánětlivé imunitní reakce. Rambeaud et Pighetti (2006) uvádí nižší afinitu neutrofilů a signifikantně nižší vápníkovou signalizační reakci na stimulaci chemokinového receptoru 1 interleukinem - 8 u krav s genotypem *CXCR1 + 777 CC*, což má přímý vliv na prozánětlivou reakci ve vemeni. A výsledky jejich studie tedy naznačují, že polymorfnní varianta *CXCR1 + 777 CC* je předpokladem k lepšímu zdraví vemene.

Výskyt somatických buněk v mléce, jako indikace zánětu vemene, v tomto sledování naznačuje asociaci genotypu *CXCR1 + 777 GG* s nižším výskytem SC během druhé a třetí laktace. Což je v souladu s výsledky dalších studií na jiných plemenech skotu, které uvádějí vztah alely *G* a nižšího výskytu SC (Youngerman et al., 2004; Beecher et al., 2010; Galvão et al., 2011). Statistickým šetřením se ale vliv polymorfismu *CXCR1 + 777 C/G* v tomto pozorování nepodařilo prokázat. Vliv tohoto polymorfismu na výskyt SC je uváděn jako neprůkazný i dalšími autory. Například Pawlik et al.(2015) ve svém výzkumu na 554 dojnicích polského holštýnského skotu téměř analogicky popisuje tendenci krav s genotypem *CC* k vyššímu počtu somatických buněk, ale zároveň uvádí celkovou statistickou neprůkaznost vztahu polymorfismu *CXCR1 + 777 C/G* k počtu SC. I v dalších studiích na holštýnském skotu nelze pozorovat vliv tohoto polymorfismu na počet somatických buněk (Leyva-Baca et al., 2008; Goertz et al., 2010;). Studie polymorfismu *CXCR1 + 777 C/G* na plemenech aysshire, monbiliard a holškýnsko-fríském skotu v tentýž chovu v Irsku, uvádí asociaci *G* alely v oblasti *CXCR1 + 777 C/G* s nižším SCC, ale statisticky průkazný vztah je popsán pouze u holštýnských dojníc (Beecher et al., 2010).

Rozdílnost výsledků některých studií může být zapříčiněna i různou velikostí sledovaných souborů. Například Youngerman et al., (2004), který uvádí vztah polymorfismu a výskytu somatických buněk, realizoval své pozorování na 37 kusech skotu. Autoři, kteří vliv polymorfismu neprokázali, prováděli své studie na rozsáhlejších souborech. Pawlik et al.(2015) popisuje své pozorování na 554 kravách, Leyva-Baca et al., (2008) pracoval s 338 kusy skotu a Zhang et al., (2016) sledoval polymorfismus *CXCR1 + 777 C/G* na 400 kravách.

Výsledky statistického vyhodnocení tohoto pozorování poukazují na významný vliv chovu na zdraví vemene. Podmínky chovu limitují realizaci genetického potenciálu zvířat pro

mléčnou užitkovost Van der Laak et al., (2016). Z důvodu nízké heretability mastitid (Sørensen, et al., 2009) je důležité věnovat těmto vlivům prostředdí pozornost. Jsou známy studie, které zdůrazňují vlivy hygieny a rutinní toalety dojení (Ruegg et al, 2006); některé vyzdvihují vliv predippingu (ošetření struků před dojením) nad postdippingem (Barnouin et al., 2014; Morton et al, 2014). Ruegg et al., (2006) uvádí, že správnou péčí o vemeno během dojení, je možné snížit riziko bakteriální infekce až o 75%. Pozornost je věnována také vlivu frekvence dojení na výskyt epiteliálních buněk v mléce, avšak zatím s nejasnými výsledky (Bernier-Dodier et al., 2010; Murney et al., 2015). Nezanedbatelný je také vliv čistoty stájí, kvality podestýlek (Green et al., 2008) a managementu chovu na výskyt infekcí vemene a množství SC (De Vliegher et al., 2004; Haskell et al., 2009). Někteří autoři také poukazují na vliv teplot a ročního období na aktivitu buněk vrozené imunity, konkrétně neutrofilů v souvislosti se zdravím vemene. Uvádí se například, že vlivem tepelného stresu stoupají v krvi zvířat hodnoty glukokortikoidů a specifických kortizolů, které ovlivňují aktivitu buněčné imunity a snižují expresi chemokinových a cytokinových receptorů. Důsledkem toho může být nižší fagocytická kompetence neutrofilů, pokles exprese rozpoznávacích, adhezních a signálních molekul (Cook et al., 2002; SunilKumar et al., 2011). Podle Swain et al. (2016) má roční období signifikantní dopad na aktivitu neutrofilů, a tak i zdraví vemene. Uvádí, že za zvýšených teplot a vlhkosti je imunitní systém dojených krav natolik zaměstnán vyrovnáváním tepelného stresu, že reakce na patogeny není uspokojivá a v letních obdobích je tak výskyt mastitid častější. Někteří autoři sice naopak popisují zimní měsíce jako rizikové období pro vznik mastitid (Olde Riekerink et al., 2007; Nava-Trujillo et al., 2010), v podmínkách České republiky je ale zaznamenán zvýšený počet somatických buněk v mléce krav během měsíců května až září (Kavapilík et al., 2016).

7 Závěr

Byla provedena genetická analýza polymorfismu *CXCR1* + 777 C/G v druhém exonu u 298 krav českého strakatého plemene. Z výsledků genotypizace bylo stanoveno zastoupení alel a genotypů v pozorovaném souboru a proběhl výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Byla provedena asociační analýza mezi uvedeným polymorfismem, výskytem somatických buněk a dojivostí u krav českého strakatého plemene. Z výsledků genotypování a statistického hodnocení vyplývá, že genotypy polymorfismu *CXCR1* + 777 C/G byly v Hardy-Weinbergově rovnováze a zastoupení genotypů i alel u českého strakatého skotu je blízké výsledkům studií u jiných plemen.

Cílem bylo zjistit vliv polymorfismu na dojivost a výskyt somatických buněk. Prostřednictvím statistického vyhodnocení prostřednictvím GLM modelu nebyl prokázán vliv žádné z polymorfních variant *CXCR1* + 777 C/G na výskyt somatických buněk v mléce nebo dojivost českého strakatého skotu. Ani jedna z hypotéz tak nebyla potvrzena. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky některých dalších studií tohoto polymorfismu na jiných plemenech skotu.

Vyhodnocení získaných dat poukazuje na význam vlivů prostředí a chovu ($P < 0,001$). Jedná se o první pozorování vlivu *CXCR1* + 777 C/G na českém strakatém skotu. Studie polymorfismu *CXCR1* + 777 C/G jiných plemen skotu uvádějí různé výsledky a tedy je možné že, další pozorování přinese jiné závěry. Na základě výsledků současného pozorování však nelze *CXCR1* + 777 využít jako genetický marker pro šlechtění českého strakatého skotu na dojivost a zdraví vemene.

8 Samostatné přílohy

Obrázek č. 3 Schéma restričního štěpení CXCR1 C (Výstup z programu CLC Sequence viewer)

```

                20          40          60          80
CXCR1-C  GAGGCCTATCAACCACCGTACTCCGACCTAGTCTGCTACGAGGACCTGGGTGCCAATACAACGAAATGGCGGATGATAATGCGTGTCT
          CTCCGGATAGTTGGTGGCATGAGGCTGGATCAGACGATGCTCCTGGACCCACGGTTATGTTGCTTTACCGCCTACTATTACGCACAG

                100          120          140          160
CXCR1-C  CTGCCCCAGACCTTTGGCTTCTCCTGCCCTGCTGGTCAATGCTGTTCTGCTACGGATTACCCCTGCGCACGGCTATTTTCAGCCCAA
          GACGGGGTCTGGAAACCGAAGGAGGACGGGGACGACCAGTACGACAAGACGATGCCTAAGTGGGACGCGTGCGATAAAAGTCGGGTT

                180          200          220          240          260
CXCR1-C  ATGGGGCABsp1286ICAAGCACCCGGGCCATGCGGGTCACTTTGCTGTCGTGCTCGTCTTCCTGCTGCTGGCTGCCCTACAACCTGGTCCTG
          TACCCCGTTCGTTGCGTGGCCCGGTACGCCAGTAGAAACGACAGGACGAGCAGAAGGACGAGACGACCGGATGTTGGACCAAGGAC

CXCR1-C  ATCGC
          TAGCG

```

Obrázek č. 4 Schéma restričního štěpení CXCR1 G (Výstup z programu CLC Sequence viewer)

```

                20          40          60          80
CXCR1-G  GAGGCCTATCAACCACCGTACTCCGACCTAGTCTGCTACGAGGACCTGGGTGCCAATACAACGAAATGGCGGATGATAATGCGTGTCT
          CTCCGGATAGTTGGTGGCATGAGGCTGGATCAGACGATGCTCCTGGACCCACGGTTATGTTGCTTTACCGCCTACTATTACGCACAG

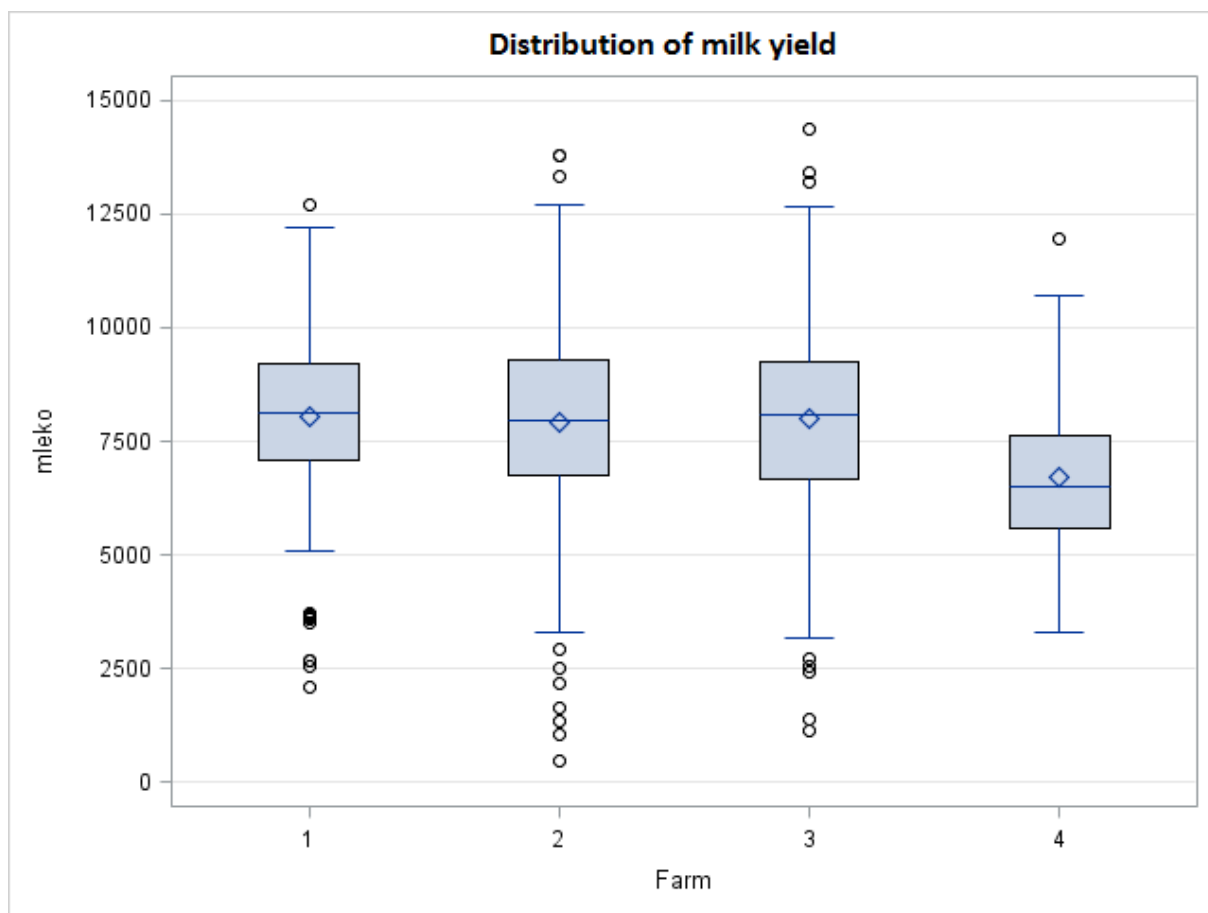
                100          120          140          160
CXCR1-G  CTGCCCCAGACCTTTGGCTTCTCCTGCCCTGCTGGTCAATGCTGTTCTGCTACGGATTACCCCTGCGCACGGCTATTTTCAGCCCAA
          GACGGGGTCTGGAAACCGAAGGAGGACGGGGACGACCAGTACGACAAGACGATGCCTAAGTGGGACGCGTGCGATAAAAGTCGGGTT

                180          200          220          240          260
CXCR1-G  ATGGGGCAGAAGCACCCGGGCCATGCGGGTCACTTTGCTGTCGTGCTCGTCTTCCTGCTGCTGGCTGCCCTACAACCTGGTCCTG
          TACCCCGTTCGTTGCGTGGCCCGGTACGCCAGTAGAAACGACAGGACGAGCAGAAGGACGAGACGACCGGATGTTGGACCAAGGAC

CXCR1-G  ATCGC
          TAGCG

```

Graf č. 2: Přehled úrovně dojivosti v jednotlivých chovech (SAS 9.4)



Tabulka 11: Přehled skórovaného výskytu SC za jednotlivé laktace podle farem. Zvýrazněny jsou nejvyšší pozorované hodnoty

Farma	LSCS za 1. laktaci LSM	LSCS za 2. laktaci LSM	LSCS za 3. laktaci LSM
1	0,7	1,1	2,1
2	0,5	0,5	1,2
3	0,2	0,2	1,4
4	2,1	2,4	3,5

Tabulka 12: Přehled dojivosti za jednotlivé laktace podle farem. Zvýrazněny jsou nejvyšší pozorované hodnoty

Farma	Dojivost za 1. laktaci LSM	Dojivost za 2. laktaci LSM	Dojivost za 3. laktaci LSM
1	7655,2	8245,9	6962,7
2	7694,9	8126,0	7610,1
3	8051,6	8390,6	7691,8
4	5726,3	6832,2	6482,0

Tabulka 13: Přehled skórovaného výskytu SC a dojivosti za jednotlivé laktace podle otců dojníc. Zvýrazněny jsou nejvyšší pozorované hodnoty

Otec dojnice	SCS za 1. laktaci LSM	SCS za 2. laktaci LSM	SCS za 3. laktaci LSM	Dojivost za 1. laktaci LSM	Dojivost za 2. laktaci LSM	Dojivost za 3. laktaci LSM
1	0,5	1,2	2	6975,8	7489,4	7489,3
2	0,4	0,4	1,5	6953,3	6311,9	6311,8
3	0,2	0	0,8	7516,6	8291,3	8291,3
4	1,2	1,1	2,7	7584,2	7647,9	7647,9
5	0,9	1	1	7852,7	7409	7409
6	1	1,4	1,9	5881,7	6761,6	6761,6
7	2,6	1,5	3,7	6003,2	6900,7	6900,7
8	0,7	0,4	3,7	6576,6	6842,9	6842,9
9	1,9	2,2	2	7196,0	8133,7	8133,6
10	1,7	2,3	5	6714,5	5318,1	5318,1
11	1,5	1,3	1,6	7673,6	8275,9	8275,8
12	0,5	0,2	1	7283,5	8365,6	8365,6
13	1,4	1,6	1,9	6370,5	7628,3	7628,3
14	1,5	0,4	2,5	6482,6	7580,6	7580,6
15	0,9	1,5	2,9	6978	7750,6	7750,6
16	0	0,9	3,3	7387,2	8867,4	8867,4
17	0,3	1,6	0,3	8585,9	9659,6	9659,6
18	0,5	0,3	0,6	7420,3	7690,7	7690,7
19	0,4	0,3	0,6	7660,5	8765,5	8765,5
20	0,1	0,6	1,2	7612,2	8407,9	8407,9
21	0,5	0,6	1,5	5703,5	6744,9	6744,9
22	0,4	0,2	3,7	10170,5	9166,6	9166,6
23	2,2	1,4	2,8	9043,9	8734,4	8734,4
24	2,6	2,7	1,5	7858,8	8068,8	8068,8
25	1,8	1,5	2,1	6976	8137,9	8137,9
26	0,9	2,3	1,6	6195,1	8805,5	8805,5
27	0,6	1,4	2,8	7496	8940,2	8940,2
28	1,2	1,9	3,5	7743,3	8466,9	8466,9

9 Seznam literatury

- Al-Qumber, M. et. Tagg. J. R. 2006. Commensal bacilli inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. *Journal of Applied Microbiology*. 101(5), 1152-1160. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03004.x. ISSN 13645072.
- Ali, A. K. A. et. Shook, G. E., 1980. An Optimum Transformation for Somatic Cell Concentration in Milk. *Journal of Dairy Science*. 63(3), 487-490. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(80)82959-6. ISSN 00220302.
- Alhussien, M. Manjari, P. Mohammed, S Aasif Ahmad Sheikh, Srinu Reddi, Satpal Dixit a Ajay K. Dang. Incidence of mastitis and activity of milk neutrophils in Tharparkar cows reared under semi-arid conditions. *Tropical Animal Health and Production*. 2016, 48(6), 1291-1295. DOI: 10.1007/s11250-016-1068-8. ISSN 00494747.
- Auffray, C., Michael H., Sieweke et Geissmann. F., 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*. 27(1), 669-692. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557. ISSN 07320582.
- Atashi, H., Zamiri M. J., et Dadpasand, M., 2013 Association between dry period length and lactation performance, lactation curve, calf birth weight, and dystocia in Holstein dairy cows in Iran. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3632-3638 ,DOI: 10.3168/jds.2012-5943. ISSN 00220302.
- Bade, R. D., Douglas J., Reinemann, A., et. Thompson P. D., 2008. Method for Assessing Teat and Udder Hygiene. ASABE. An ASABE Meeting Presentation, Michigan USA, 2008, 08(083796). DOI: DOI: 10.13031/2013.24903.
- Baggiolini, M., et Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*. 307(1), 97-101. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80909-Z. ISSN 00145793.
- Banfi, G., Salvagno G.L., et Lippi, G., 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*., 45(5), DOI: 10.1515/CCLM.2007.110. ISSN 14346621.

- Barber, M. (1999). Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, pp. 791-798.
- Barabaschi, D., Tondelli, A., Desiderio, F., Volante, A., Vaccino, P., Valè, G. et Cattivelli, L., 2016. Next generation breeding. *Plant Science*. 2016, 242, 3-13. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.07.010. ISSN 01689452.
- Barnouin, J., Chassagne, M., Bazin, S., et Boichard, D., 2004. Management Practices from Questionnaire Surveys in Herds with Very Low Somatic Cell Score Through a National Mastitis Program in France. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3989-3999. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73539-0. ISSN 00220302.
- Barra, G., Barcelos, T. H., Santa Rita, J., De Almeida Vasques, C., Figueiredo Chianca, L. F., Nery et S.S.S Costa. 2015. Edta-Mediated Inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clinical Biochemistry*, 48(15), 976-981. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.02.014. ISSN 00099120.
- Belardelli, F., 2002, Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in Immunology*. 23(4), 201-208 DOI: 10.1016/S1471-4906(02)02195-6. ISSN 14714906.
- Bennewitz, J., Reinsch, N., Grohs, C., 2003. Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*. 35(3), 319-338. DOI: 10.1051/gse:2003011. ISSN 0999193x.
- Beecher, C., Daly, M., Childs, S., Berry, D., Magee, D., McCarthy, T., et 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), pp. 99-.
- Berahovich, R. D., Lai, N. L., Wei, L., Lanier, L. L. et Schall, T. J., 2006. Evidence for NK Cell Subsets Based on Chemokine Receptor Expression. *The Journal of Immunology*, 177(11), 7833-7840 .DOI: 10.4049/jimmunol.177.11.7833. ISSN 00221767.
- Bernier-Dodier, P., Delbecchi, L., Wagner, G. F., Talbot, B. G., et Lacasse P. 2010. Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation

cows1. *Journal of Dairy Science.*, 93(2), 555-564 DOI: 10.3168/jds.2009-2320. ISSN 00220302.

Beuzen, N. D., M. J. Stear a K. C. Chang. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal.* 160(1), 42-52 DOI: 10.1053/tvj.2000.0468. ISSN 10900233.

Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., Malchiodi, F., Sturaro, E., Tagliapietra, F., Schiavon S. et. Cecchinato. A., 2015. Effect of dairy farming system, herd, season, parity, and days in milk on modeling of the coagulation, curd firming, and syneresis of bovine milk. *Journal of Dairy Science.* 98(4), 2759-2774. DOI: 10.3168/jds.2014-8909. ISSN 00220302.

Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, C., et Cecchinato.A., 2016. The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science.* 99(7), 5104-5119. DOI: 10.3168/jds.2015-10512. ISSN 00220302.

Bobrovnikova-Marjon, E. 2004. Expression of Angiogenic Factors Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8/CXCL8 Is Highly Responsive to Ambient Glutamine Availability: Role of Nuclear Factor- B and Activating Protein-1. *Cancer Research*, 64(14), pp. 4858-4869.

Bochniarz, M., Adaszek, Ł., Dzięgiel, B., Nowaczek, A., Wawron, W., Dąbrowski, R., Szczubiał, M., & Winiarczyk, S. 2016. Factors responsible for subclinical mastitis in cows caused by *Staphylococcus chromogenes* and its susceptibility to antibiotics based on *bap*, *fnbA*, *eno*, *mecA*, *tetK*, and *ermA* genes. *Journal of Dairy Science*, 99(12), pp. 9514-9520.

Botsaris, G., Kyriaki N., Liapi, M., et Pipis,Ch., 2016. Prevalence of *Listeria Spp.* and *Listeria Monocytogenes* in Cattle Farms in Cyprus using Bulk Tank Milk Samples. *Journal of Food Safety.* 36(4), 482-488. DOI: 10.1111/jfs.12265. ISSN 01496085.

Bouška, J., 2006. Chov dojeného skotu. Praha. Profi Press, str186. ISBN 8086726169.

Bradley, A. J. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal.*, 164(2), 116-128 .DOI: 10.1053/tvj.2002.0724. ISSN 10900233

Bradley, A., & Green, M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In Practice*, 27(6), pp. 310-315.

- Burnet, M., 1970. Immunological surveillance. 7. Oxford, New York: Pergamon Press, ISBN 9780080174815.
- Butler, W. R., Everett, R. W., et Coppock, C. E., 1981. The Relationships between Energy Balance, Milk Production and Ovulation in Postpartum Holstein Cows. *Journal of Animal Science*. 53(3), 742-. DOI: 10.2527/jas1981.533742x. ISSN 00218812.
- Bytyqi, H., Zaugg, U., et Sherif, K., 2010. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw cow milk in Kosovo. *Veterinary Archives*. 80(2), 173-183. ISSN 0372-5480.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, R., 2006. ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. *Science*. 2006, 314(5806), 1792-1795. DOI: 10.1126/science.1132559. ISSN 00368075.
- Collard, B., Jahufer, M., Brouwer, J., & Pang, E. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), pp. 169-196.
- Cook, N. B., Bennett, T. B., Emery, K. M., et Nordlund, K. V., 2002. Monitoring Nonlactating Cow Intramammary Infection Dynamics Using DHI Somatic Cell Count Data. *Journal of Dairy Science*. 85(5), 1119-1126 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74173-8. ISSN 00220302.
- Coulona, J-B., Gasquib, P., Barnouin, P., Ollier, A., Pradel P., et Pomiès, D., 2002. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research*., 51(05), 383-393. DOI: 10.1051/animres:2002031. ISSN 16273583.
- Daniel, J. B., Friggens, N. C., Chapoutot, P., Van Laar, H., et Sauvant, D., 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal*. 10(12), 1975-1985 DOI: 10.1017/S1751731116001245. ISSN 17517311.
- De Forge, L, Preston, A., et Takeuchi, E., 1993, Regulation of Interleukin 8 Gene Expression by Oxidant Stress. 268. USA: The Journal of Biological Chemistry, ISBN 2556825576.
- De Haas, Y., Ouweltjes, W., Ten Napel, T., Windig, J. J., De Jong, G., 2008. Alternative Somatic Cell Count Traits as Mastitis Indicators for Genetic Selection. *Journal of Dairy*

Science [online]., 91(6), 2501-2511 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.3168/jds.2007-0459. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208712025>

De Los Campos, G., Gianola, D., Boettcher, P., et Moroni, P., 2006. A structural equation model for describing relationships between somatic cell score and milk yield in dairy goats. *Journal of Animal Science*. 84(11), 4445-4455. DOI: 10.2527/jas.2006-016. ISSN 15253163.

De Vliegher, S., Laevens, Barkema, H. W., Dohoo, I. R., Stryhn, H., Opsomer, G., et De Kruif, A., 2004. Management Practices and Heifer Characteristics Associated with Early Lactation Somatic Cell Count of Belgian Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 937-947. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73238-5. ISSN 00220302

Dohmen, W., Neijenhuis, F., et Hogeveen, H., 2010. Relationship between udder health and hygiene on farms with an automatic milking system. *Journal of Dairy Science*. 2010, 93(9), 4019-4033. DOI: 10.3168/jds.2009-3028. ISSN 00220302.

Doležal, O., 2000 *Mléko, dojení, dojírny*. Praha: Agrospoj.

Doležal, O., Staněk, S., Bečková, I., Černá D., et Dolejš J., 2015. *Chov dojeného skotu: technologie, technika, management*. Praha: Profi Press. ISBN 9788086726700.

Eastridge, M. L. 2006. Major Advances in Applied Dairy Cattle Nutrition. *Journal of Dairy Science*. 89(4), 1311-1323. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72199-3. ISSN 00220302.

El-Awady, H. G. et Oudah. E. Z. M. 2011. Genetic and Economic Analysis for the Relationship between Udder Health and Milk Production Traits in Friesian Cows. [online] *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(11), 1514-1524 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.5713/ajas.2011.10328. ISSN 10112367. Dostupné z: <http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2011.10328>

Esposito, G., Irons, P. C., Webb E. C., et Aspinas Chapwanya. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 144(3-4), 60-71. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.007. ISSN 03784320.

Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., et Barros-Velázquez, J., 2014 The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*., 1-31. DOI: 10.1155/2014/659801. ISSN 23567708

Ferenčík, M., 2005. Imunitní systém: informace pro každého. Vyd. 1. české. Praha: Grada. ISBN 8024711966

Ferrero, F., Valledor, M., & Campo, J. 2014. Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement*, vol. 47, pp. 855-860.

Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O., Andersen, P., & Girardin, S., 2006. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-8 generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 0(0), pp. 061127015327006.

Fleischer, P., Metzner, M., Beyerbach, M., Hoedemaker M., et Klee, W., 2001. The Relationship Between Milk Yield and the Incidence of Some Diseases in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* [online]. 84(9), 2025-2035. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74646-2. ISSN 00220302.

Fleming, A., Schenkel, F. S., Koeck, A., Malchiodi, F., Ali, R. A., Corredig, M., Mallard, B., Sargolzaei, M., 2017. Heritabilities of measured and mid-infrared predicted milk fat globule size, milk fat and protein percentages, and their genetic correlations. *Journal of Dairy Science* [online]. 100(5), 3735-3741 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.3168/jds.2016-12243. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021730228X>

Fogsgaard, K., Bennedsgaard, T., et Herskin, M. 2015. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 98(3), pp. 1730-1738.

Fox, L. K., Kirk, J. H., et Britten, A., 2005. *Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control*. *Journal of Veterinary Medicine Series B.*, 52(4), 153-160. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2005.00845.x. ISSN 09311793.

Frandsen, R. D., Wilke, W. L. et De Fails A., 2009, *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. 7, str 454. Colorado: John Wiley, 2009. ISBN 9780813823218.

Fulmer, T., 2010 Targeting chemokines in breast cancer. *Science-Business eXchange* [online]. 2010-1-28, 3(4), - [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1038/scibx.2010.105. ISSN 19453477. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scibx.2010.105>

- Galligan, C. L et Coomber. B. L., 2000. Effects of human IL-8 isoforms on bovine neutrophil function in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 74(1-2), 71-85. DOI: 10.1016/S0165-2427(00)00162-8. ISSN 01652427.
- Galvão, K., Pighetti, G., Cheong, S., Nydam, D., et Gilbert, R. 2011. Association between interleukin-8 receptor- α (CXCR1) polymorphism and disease incidence, production, reproduction, and survival in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(4), pp. 2083-2091.
- Garcia, A., 2004. Contagious vs. Environmental Mastitis. Extension Extra. Paper. South Dakota State University: SDSU Extension (126).
- Gasser, O. 2006. Cyclooxygenase regulates cell surface expression of CXCR3/1-storing granules in human CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, 177(12), pp. 8806-8812.
- Goertz, I., C. Baes, C. Weimann, N. Reinsch A G. Erhardt. 2009. Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 92(8), 4018-4022 DOI: 10.3168/jds.2008-1536. ISSN 00220302
- Golden, B.L., Garrick, D.J., et Benyshek, L.L., 2009. Milestones in beef cattle genetic evaluation. *Journal of Animal Science*, 87(Num 14, Supp 09), pp. E3-E10.
- Gray, C., Strandberg, Y., Donaldson, L., et Tellam, R. 2005. Bovine mammary epithelial cells, initiators of innate immune responses to mastitis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(8), pp. 757-.
- Grieger, C., 1990. *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*. Bratislava: Príroda, 1990. ISBN 8007002537.
- Green, M. J., Bradley, A. J., Medley, G. F., et Browne, W. J.. 2008. Cow, Farm, and Herd Management Factors in the Dry Period Associated with Raised Somatic Cell Counts in Early Lactation. *Journal of Dairy Science*. 91(4), 1403-1415. DOI: 10.3168/jds.2007-0621. ISSN 00220302.
- Greene, W., Gano, A., Smith, K., Hogan, J., et Todhunter, D. 1991. Comparison of Probiotic and Antibiotic Intramammary Therapy of Cattle with Elevated Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 74(9), pp. 2976-2981.

Harmon, R. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), pp. 2103-2112.

Haskell, M. J., Langford, F. M., Jack, M. C., Sherwood, L., Lawrence, A. L., et Rutherford, K. M. D., 2009. The effect of organic status and management practices on somatic cell counts on UK dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 92(8), 3775-3780 DOI: 10.3168/jds.2009-2105. ISSN 00220302.

Hayes, B., et Goddard, M. 2001. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genetics Selection Evolution*, 33(3), pp. 209-229.

Havixbeck, J. J., Rieger, A. M., Wong, M. E., Hodgkinson, J. W., et Barreda, D. R., 2016. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *Journal of Leukocyte Biology*. 99(2), 241-252. DOI: 10.1189/jlb.3HI0215-064R. ISSN 07415400.

Heaton, M. P., Grosse, W. M., Kappes, S. M., Keele, J. W., Chitko-McKown, C. G., 2001. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes. *Mammalian Genome*. 12(1), 32-37. DOI: 10.1007/s003350010223. ISSN 09388990.

Hejlíček, K., 1987 Mastitidy skotu. Praha. SZN.154-160s.

Hofírek, B. 2009. Nemoci skotu. (1). Brno. Noviko, ISBN:978-80-86521-19-5, 11-49 s.

Hořejší, V. 2013. Základy imunologie. (4. vyd.), s. 25-32. Praha: Triton.

Hovinen, M. et S. Pyörälä. 2001. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *Journal of Dairy Science*. 94(2), 547-562 .DOI: 10.3168/jds.2010-3556. ISSN 00220302.

Jagoš, P. a kol, 1985. Diagnostika, terapie a prevence nemocí skotu. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 472 s., ISBN 07-021-85

Jamrozik, J., Bohmanova, J., et Schaeffer, L. R., 2010. Relationships between milk yield and somatic cell score in Canadian Holsteins from simultaneous and recursive random regression models. *Journal of Dairy Science*. 93(3), 1216-1233. DOI: 10.3168/jds.2009-2585. ISSN 00220302.

Jílek, P. (2014). Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 4. vyd., s64, Praha: Grada.

Kanevsky-Mullarky, I., Nedrow, A., Garst, S., Wark, W., Dickenson, M., Petersson-Wolfe, C., & Zadoks, R. 2014. Short communication: Comparison of virulence factors in *Klebsiella pneumoniae* strains associated with multiple or single cases of mastitis. *Journal of Dairy Science*, 97(4), pp. 2213-2218.

Kehrli, M., et Shuster, D., 1994. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 77(2), pp. 619-627.

Keightley, P. 1992. Quantitative Genetic Variation in Body Size of Mice from New Mutations. *Genetics*, 131(3), pp. 693–700.

Kelly, A. L., D. Tiernan, C. O'sullivan A P. Joyce. 2000. Correlation Between Bovine Milk Somatic Cell Count and Polymorphonuclear Leukocyte Level for Samples of Bulk Milk and Milk from Individual Cows. *Journal of Dairy Science*., 83(2), 300-304. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74878-8. ISSN 00220302.

Kivaria, F. M., Noordhuizen, J. P. T. M et Kapaga, A. M., 2006. Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*., 38(3), 185-194. DOI: 10.1007/s11250-006-4339-y. ISSN 00494747.

Krejsek, J., & Kopecký, O., 2004a. *Klinická imunologie*. (1. vyd.). Hradec Králové: Nucleus HK.s 385,387

Krejsek, J., & Kopecký, O., 2004b. *Klinická imunologie*. (1. vyd.). Hradec Králové: Nucleus HK.s,411

Kvapilík, J., Pytloun, J., et Bucek, P., 2007 *Ročenka: Chov skotu v České republice, hlavní výsledky a ukazatele za rok 2006*. Praha,

Kvapilík, J. 2014a. Mastitidy a výrobní ztráty. *Veterinářství*. 64(7). 550 – 560.

Kvapilík, J., 2014b. Mastitidy dojených krav a ekonomické ztráty. *Veterinářství*. 64(12). 946-955.

Kvapilík, J., Kučera, J., Buncek P., 2016. *Ročenka: Chov skotu v České republice, hlavní výsledky a ukazatele za rok 2015*. Praha.

Lackie, J. 2010. *A dictionary of biomedicine*. (1st ed.). Oxford: Oxford University Press.

- Lahouassa, H., Rainard, P., Caraty, A., et Riollot, C., 2008. Identification and characterization of a new interleukin-8 receptor in bovine species. *Molecular Immunology*. 45(4), 1153-1164. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.07.011. ISSN 01615890.
- Langoni, D. B., Hélio, H., 2011. Breed and season influence on milk quality parameters and in mastitis occurrence. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(12), 1045-1052. DOI: 10.1590/S0100-736X2011001200002. ISSN 0100736x.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Yves Le Loir, A., 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products - a review. *Dairy Science & Technology*, 91(3), 247-282. DOI: 10.1007/s13594-011-0009-6. ISSN 19585586.
- Lee, J., Paape, M., Elsasser, T., et Zhao, X. 2003. Elevated Milk Soluble CD14 in Bovine Mammary Glands Challenged with Escherichia coli Lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*, 86(7), pp. 2382-2389.
- Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Martin, J., et Karrow, N. 2008. Polymorphisms in the 5' Upstream Region of the CXCR1 Chemokine Receptor Gene, and Their Association with Somatic Cell Score in Holstein Cattle in Canada. *Journal of Dairy Science*, 91(1), pp. 407-417.
- Li, J. N., Baskaran, H., Dertinger, S. K. H., Whitesides, G. M., Van De Water, L., et Toner, M., 2002. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature Biotechnology*. 20(8), 826-830. DOI: 10.1038/nbt712. ISSN 10870156.
- Lin, Y., et Xia, L. 1995. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium in vitro. *American Journal of Veterinary Research*, 56(2), pp. 203-207.
- Mackay, I. R., Rosen F. S., Medzhitov R et Janeway Ch., 2000. Innate Immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338-344. DOI: 10.1056/NEJM200008033430506. ISSN 00284793.
- Makovec, J., & Ruegg, P., 2003. Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86(11), pp. 3466-3472.
- Mócsai, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine* 210(7), 1283-1299. DOI: 10.1084/jem.20122220. ISSN 00221007.

Mol, J., et Clegg, R. 2000. *Biology of the mammary gland*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Montaldo, H. H., Meza-Herrera, CA., 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology.*, 1(2), 83-89. DOI: 10.2225/vol1-issue2-fulltext-4. ISSN 07173458.

Montaldo, H. H. 2006. Genetic engineering applications in animal breeding. *Electronic Journal of Biotechnology.*, 9(2), 157-170 DOI: 10.2225/vol9-issue2-fulltext-7. ISSN 07173458.

Moussaoui, F., Michelutti, I., Le Roux, Y., et Laurent, F. 2002. Mechanisms Involved in Milk Endogenous Proteolysis Induced by a Lipopolysaccharide Experimental Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 85(10), pp. 2562-2570.

Moussaoui, F., et Vangroenweghe, F. 2004. Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal Of Dairy Science*, 87(9), pp. 2923-2931. ISSN 0022-0302.

Morton, J. M., Penry, J. P., Malmo, J., et Mein, G. Q., 2014. Premilking teat disinfection: Is it worthwhile in pasture-grazed dairy herds? *Journal of Dairy Science*. 2014, 97(12), 7525-7537. DOI: 10.3168/jds.2014-8185. ISSN 00220302.

Moyes, Kasey M., James K. Drackley, Dawn E. Morin a Juan J. Loo. 2010. Greater expression of TLR2, TLR4, and IL6 due to negative energy balance is associated with lower expression of HLA-DRA and HLA-A in bovine blood neutrophils after intramammary mastitis challenge with *Streptococcus uberis*. *Functional & Integrative Genomics* 10(1), 53-61 DOI: 10.1007/s10142-009-0154-7. ISSN 1438793x.

Murney, R., Stelwagen, K., Wheeler, T. T., Margerison, J. K., a Singh, K., 2015. The effects of milking frequency in early lactation on milk yield, mammary cell turnover, and secretory activity in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98(1), 305-311. DOI: 10.3168/jds.2014-8745. ISSN 00220302.

Nava-Trujillo H., Soto-Belloso E., Hoet A. E. 2010. Effects of clinical mastitis from calving to first service on reproductive performance in dual-purpose cows. *Animal. Reproduction. Science*, [online]. 121, 12–16. DOI:10.1016/j.anireprosci.2010.05.014 ISSN 03784320 [cit. 2017-04-13] Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010003398>

Nariadení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004: Zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. 2004, Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/txt/pdf/?uri=celex:32004r0853&from=cs>.

Nash D. L., Rogers G. W., Cooper, G. L., Hargrove J. F. et Hansen, L. B., 2000, Heritability of Clinical Mastitis Incidence and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score, Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. [online]. *Journal of Dairy Science* 83(10), 2350-2360 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75123-X. ISSN 00220302. [cit. 2017-04-13]. Dostupné z <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020075123X>

Navajas, E.A., 2014. *Animal Breeding and Genetics. DNA Markers and Marker-Assisted Selection in the Genomic Era. Encyclopedia of Meat Sciences* . Uruguay: Elsevier, 2014, s. 12. DOI: 10.1016/B978-0-12-384731-7.00002-7. ISBN 9780123847348.

Newsholme, P., Pithon Curi T. C., Murphy, C.J., Garcia, C., Pires De Mello, A M.. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* .1999, 10(6), 316-324. DOI: 10.1016/S0955-2863(99)00022-4. ISSN 09552863.

Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A., Dovc, P., 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. 40(6), 832-. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x. ISSN 02689146.

Olde Riekerink, R. G., Barkema HW., et Stryhn, H. 2007. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2007, 90(4), 1704-1715. DOI: 10.3168/jds.2006-567. ISSN 00220302.

Ondráková, M., 2016 Čtyři roky genotypizace českého strakatého skotu (I) [online]. In: *Náš chov*, 1 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: <http://naschov.cz/ctyri-roky-genotypizace-ceskeho-strakateho-skotu-i/>

Osteras, O., 2006. Mastitis epidemiology, Practical approaches and applications, *WBC*;203-215

Paape, M., et. Guidry, A., 1969. Effect of Milking on Leucocytes in the Subcutaneous Abdominal Vein of the Cow. *Journal of Dairy Science*, 52(7), pp. 998-1002.

Pankey, J., Nickerson, S., Boddie, R., & Hogan, J. 1985. Effects of *Corynebacterium bovis* Infection on Susceptibility to Major Mastitis Pathogens. *Journal of Dairy Science*, 68(10), pp. 2684-2693.

Patel, Y. G., Trivedi, M. M., Rajpura, R. M., Savaliya, F. P., a Parmar,M., 2016. Udder And Teat Measurements And Their Relation With Milk Production In Crossbred Cows. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 5(5), 3048 – 3054. ISSN ISSN 2278-3687.

Paul, W. 1989. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell*, 57(4), pp. 521-524.

Pawlik, A., Sender, G., Kapera,M., et Korwin-Kossakowska,A., 2015. Experimental immunology Association between interleukin 8 receptor α gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Central European Journal of Immunology*. 2015, 2, 153-158. DOI: 10.5114/ceji.2015.52828. ISSN 14263912.

Persson Waller, K., Colditz, I. G., Lun, S., et Östensson,K., 2003 Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Research in Veterinary Science.*, 74(1), 31-36. DOI: 10.1016/S0034-5288(02)00147-9. ISSN 00345288.

Piepers, S., De Meulemeester,L., De Kruif,A., Opsomer,G., Barkema,H. B., et De Vliegher,S., 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*. 74(04),DOI: 10.1017/S0022029907002841. ISSN 00220299.

Pighetti, G., Kojima, C., Wojakiewicz, L., & Rambeaud, M., 2012. The bovine CXCR1 gene is highly polymorphic. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1-2), pp. 464-470.

Pillai, S.R., E. Kunze, L.M. Sordillo, A.B.M., Jayarao. 2001.Application of Differential Inflammatory Cell Count as a Tool to Monitor Udder Health. *Journal of Dairy Science.*, 84(6), 1413-1420. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70173-7. ISSN 00220302.

Pokorska, J., Dusza,M., Kułaj, D., Żukowski,K., et Makulska,J., 2016. Single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. *Genetics and Molecular Research*. 15(2), -.DOI: 10.4238/gmr.15027247. ISSN 16765680.

Prin-Mathieu, C., Le Roux, Y., Faure, G., Laurent, F., Bene, M., et Moussaoui, F., 2002. Enzymatic Activities of Bovine Peripheral Blood Leukocytes and Milk Polymorphonuclear

Neutrophils during Intramammary Inflammation Caused by Lipopolysaccharide. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(4), pp. 812-817.

Proudfoot, A. E. I., 2002 Chemokine Receptors: Multifaceted Therapeutic Targets. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2(2), 106-115 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1038/nri722. ISSN 14741733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri722>

Prýmas, L., 2015. PH mléka pro straky zbrusu nově. *Náš chov* [online]. ProfiPress, [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <http://naschov.cz/ph-mleka-pro-straky-zbrusu-nove/>

Rainard, P. et Riollet, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*. 2006, 37(3), 369-400 DOI: 10.1051/vetres:2006007. ISSN 09284249.

Rambeaud, M. et Pighetti, G. M., 2005. Impaired Neutrophil Migration Associated with Specific Bovine CXCR2 Genotypes. *Infection and Immunity*, 73(8), 4955-4959. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4955-4959.2005. ISSN 00199567.

Rambeaud, M. a Pighetti, G. M., 2006, Differential calcium signaling in dairy cows with specific CXCR1 genotypes potentially related to interleukin-8 receptor functionality. *Immunogenetics* [online]. 59(1), 53-58 . DOI: 10.1007/s00251-006-0170-x. ISSN 00937711.

Reece, W., 2009. *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. (4th ed.). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Rendos, J.J., Eberhart, R.J., et Kesler, E.M., 1975. Microbial Populations of Teat Ends of Dairy Cows, and Bedding Materials. *Journal of Dairy Science*. 58(10), 1492-1500. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84740-0. ISSN 00220302.

Ribaut, J.-M. et Ragot, M. 2006. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 351-360. DOI: 10.1093/jxb/erl214. ISSN 00220957.

Ron, M. et Weller, J. I., 2007. From QTL to QTN identification in livestock - winning by points rather than knock-out: a review. *Animal Genetics*., 38(5), 429-439 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2007.01640.x. ISSN 02689146.

Rupp, R., et Boichard, D., 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 34(5), 671-688 DOI: 10.1051/vetres:2003020. ISSN 09284249.

Řehout, V, Bláhová, B., Čítek, J., a Karabačová, I., 2003. Základy genetiky a poradenství. České Budějovice, Dostupné také z: online http://www.zsf.jcu.cz/cs/katedra/katedra-klinickyh-a-preklinickyh-oboru/import/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi [cit. 2017-03-23]

Ribaut, J., et Ragot, M. 2006. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), pp. 351-360.

Riollet, C., 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (480), pp. 247-258.

Ron, M., et Weller, J., 2007.. From QTL to QTN identification in livestock - winning by points rather than knock-out: a review. *Animal Genetics*, 38(5), pp. 429-439.

Ruegg, P., Dam Rasmussen, M., et Reinemann, D., 2006. The Seven Habits of Highly Successful Milking Routines. *Advances in Dairy Technology*. Dept. of Dairy Science, 1675 Observatory Dr., Madison WI 53706: WCDS, 18, 317-326.

SAS 9,4 Institute

Sato, K., Bartlett, P.C., Kaneene, J. B., et Downes, F. P., 2004 Comparison of Prevalence and Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter* spp. Isolates from Organic and Conventional Dairy Herds in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1442-1447 .DOI: 10.1128/AEM.70.3.1442-1447.2004. ISSN 00992240.

SAS (9.4 Institute), 2017

Savill, J. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 83(3), pp. 865-875.

Schallibaum, M., 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. Proc. 40th Annual Meeting, National Mastitis Council (NMC). NMC, Madison, WI; :38–46. In: Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, B., et Cecchinato, A., 2016. The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science*. 2016, 99(7), 5104-5119 DOI: 10.3168/jds.2015-10512. ISSN 00220302.

Schreiner, D. A. et Ruegg.P. L., 2003. Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*. 86(11), 3460-3465 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2. ISSN 00220302.

Shi, Ch., et Pamer, E. G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. (11), 762-774 DOI: 10.1038/nri3070. ISSN 14741733.

Sinowatz, F., Kölle,S., Schams, D., Plath,A., 2002. Expression and Localization of Growth Factors during Mammary Gland Development. *Biology of the Mammary Gland*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002, s. 19.DOI: 10.1007/0-306-46832-8_3. ISBN 0306464144.

Singh, U., Rajib,D., Alyethodi,R. R., Rani, A., Sushil, K., Chakraborty,S., Dhama,K., et Sharma,A., 2014. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 6(2), 49-58. DOI: 10.1016/j.bgm.2014.03.001. ISSN 22140247

Skládanka, J., Doležal,O., Hegedusová, Z., Holásek,R., Chládek,G., Kopec,T., Kučera,J., Kropsch,M., Kvapilík,J., Ofner-Schrock, E., Ondráková,M., Strapák,P., 2014. Chov strakatého skotu. (Vydání: první) s 19-27. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN, 978-80-7509-258-8

Smith, G. W. et Rosa, G. J. M., 2007. Interpretation of microarray data: Trudging out of the abyss towards elucidation of biological significance. *Journal of Animal Science*. 2007, s 85.DOI: 10.2527/jas.2006-479. ISSN 15253163.

Snustad, D., et Simmons, M. Relichová, J., (2009). *Genetika*. (Vyd. 1.). Brno: Masarykova univerzita.

Sordillo, L., Shafer-Weaver, K., et DeRosa, D., 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), pp. 1851-1865.

Sordillo, L. M., Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7(2). 135-46.

Sordillo, L. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98(1-2), pp. 89-99.

- Sordillo, L. M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *Journal of Dairy Science*. 2016, 99(6), 4967-4982 DOI: 10.3168/jds.2015-10354. ISSN 00220302.
- Sørensen, L.P., T. Mark, P. Madsen A M.S., Lund., 2009. Genetic correlations between pathogen-specific mastitis and somatic cell count in Danish Holsteins. *Journal of Dairy Science* [online]. 2009, 92(7), 3457-3471 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.3168/jds.2008-1870. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209706642>
- Statistica 12, StatSoft 2017
- Strapák, P., 2013. Chov hovädzieho dobytku. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2013. ISBN 9788055209944.
- Sunil K., Kumar, A.B.V., et Kataria, M., 2011. Effect of heat stress in tropical livestock and different strategies for its amelioration. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. Division of Animal Biochemistry, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, 243122 (U. P), India, 2011, 7(1), 45-54. ISSN 1997-0838.
- Swain, D. K., Kumar, J., Yadav, S., Singh, S.K., Singh, Y., et Dang, A.K., 2016. The functional dynamics of neutrophils during different seasons in zebu cattle. *Biological Rhythm Research*., 48(2), s227-237. DOI: 10.1080/09291016.2016.1251937. ISSN 09291016.
- Takata, H., T. Naruto a M. Takiguchi., 2012 Functional heterogeneity of human effector CD8+ T cells. *Blood*. 119(6), 1390-1398. DOI: 10.1182/blood-2011-03-343251. ISSN 00064971.
- Tančin, V., 2013. Somatic cell counts in milk of dairy cows under practical conditions. *Slovak Journal of Animal Science*, 46(1), pp. 31-34.
- Tighe, M. et Brown, M., 2015. *Mosby's comprehensive review for veterinary technicians*. 4th ed., s. 386;. St. Louis: Elsevier Mosby, ISBN 9780323171380.
- Toman, M., 2009. *Veterinární imunologie*. (2., dopl. a aktualiz. vyd.). Praha: Grada.
- Tsuchida, S., Yamada, Y., Fukui, E., et al. 2010 Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms in the CXCR1 Gene and Association with Calf Diseases in Japanese Black Cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 72(12), s1609-1614. DOI: 10.1292/jvms.10-0050. ISSN 09167250.
- Uthaisangsook, S., Day, N., Bahna, S., Good, R., & Haraguchi, S. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 88(3), pp. 253-265.

- Urban, F., 1997. Chov dojeného skotu. 2. Praha: Apros, ISBN 809011007X.
- Van der Laak, M., Van Pelt, M.L., De Jong, G., et Mulder, H.A., 2016. Genotype by environment interaction for production, somatic cell score, workability, and conformation traits in Dutch Holstein-Friesian cows between farms with or without grazing. *Journal of Dairy Science* [online]., 99(6), 4496-4503 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.3168/jds.2015-10555. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216301151>
- Van Soest, F., Santman-Berends, I., Lam, T., et Hogeveen, H., 2016. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 99(10), pp. 8365-8374.
- Van Straten, M., Friger, M., et Shpigel, N. Y., 2009. Events of elevated somatic cell counts in high-producing dairy cows are associated with daily body weight loss in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 92(9), 4386-4394. DOI: 10.3168/jds.2009-2204. ISSN 00220302.
- Velechovská, J., 2016. Strakatý skot v roce 2016. Náš chov [online]. ProfiPress, [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://naschov.cz/strakaty-skot-v-roce-2016/>
- Verbeke, J., 2015. The role of CXCR1 gene polymorphisms in bovine neutrophil traits and mastitis. Merelbeke, Belgium dostupné [cit. 2017-03-28]. Online: <http://hdl.handle.net/1854/LU-5802883>. Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine. ISBN 9789058644060
- Verbeke, J., Van Poucke, M., Peelman, L., & De Vliegher, S., 2015. Differential expression of CXCR1 and commonly used reference genes in bovine milk somatic cells following experimental intramammary challenge. *BMC Genetics*, 16(1), pp. -.
- Wagner, A. M. A P. L. Ruegg. 2002. The Effect of Manual Forestripping on Milking Performance of Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*., 85(4), 804-809. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74139-8. ISSN 00220302.
- Wakchaure, R., et Ganguly, S., 2015. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 06(05), pp. -.
- Waller, K., 2002. Mammary Gland Immunology Around Parturition. In *Biology of the Mammary Gland*. (p. 231). Boston: Kluwer Academic Publishers.

- Wall, R., Powell, A., Sohn, E., Foster-Frey, J., Bannerman, D., et Paape, M., 2009. Enhanced Host Immune Recognition of Mastitis Causing Escherchia Coli in CD-14 Transgenic Mice. *Animal Biotechnology*, 20(1), 1-14. DOI: 10.1080/10495390802594206. ISSN 10495398.
- Wall, S., Wellnitz, O., Hernández-Castellano, L., Ahmadpour, A., et Bruckmaier, R., 2016. Supraphysiological oxytocin increases the transfer of immunoglobulins and other blood components to milk during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid–induced mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(11), pp. 9165-9173.
- Wakchaure, R., et Ganguly,S., Praveen, K. P., Kumar, A., Subhash, A., Mahajan,T., 2015. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*. 06(05), DOI: 10.4172/2157-7609.1000e127. ISSN 21577609.
- Watanabe, A., et Yagi, Y., 2008.Effects of intramammary infusions of interleukin-8 on milk protein composition and induction of acute-phase protein in cows during mammary involution. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2008, 72(3), 291–296.
- Widdison, S., Coffey, A.T.J., 2011. Cattle and chemokines: evidence for species-specific evolution of the bovine chemokine system. *Animal Genetics* [online], 42(4), s341-353. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02200.x. ISSN 02689146.
- Wiggans, G. R., & Shook, G. E., 1987. A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 70 266–267
- Wilson, D., González, R., Hertl, J., Schulte, H., Bennett, G., Schukken, Y., & Gröhn, Y. 2004. Effect of Clinical Mastitis on the Lactation Curve: A Mixed Model Estimation Using Daily Milk Weights. *Journal of Dairy Science*, 87(7), pp. 2073-2084.
- Woodward, W. D.1987. In Vitro Growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Can J Vet Res.*, 51(1), 27–31. ISSN PMID: 3552170.
- Wojdak-Mak,K., Kmiec,M., Kowalewska,I., et Warlinski,M. 2010. DRB3 Gene Polymorphism and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(9), pp. 1295-1300.
- Wright, H.L., Moots,R.J., Bucknall,R.C., et Edwards,S.W. 2010 Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 49(9), 1618-1631 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1093/rheumatology/keq045. ISSN 14620324.

Xie, W., Deng, H., Li, H., Bowen, T., Strong, J., et Zhang, J. 2006. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*, 142(3), pp. 809-822.

Youngerman, S., Saxton, A., Oliver, S., et Pighetti, G. 2004. Association of CXCR2 Polymorphisms with Subclinical and Clinical Mastitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(8), pp. 2442-2448.

Zhang, Z., Li, Xang, J.P., Luo, Y.J., Wang, X.R., Liu L.H., et Li, H.S., 2016. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), s 6484-6493 . DOI: 10.3168/jds.2016-10932. ISSN 00220302.

Zlotnik, A., Morales, J., et Hedrick, J.A., 1999. Recent Advances in Chemokines and Chemokine Receptors. *Critical Reviews™ in Immunology* [online]. 19(1), s47 DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v19.i1.10. ISSN 21626472.

Internetové zdroje:

AnimalGenome. NAGRP - Bioinformatics Coordination Program. [online] 2003 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.animalgenome.org/%20QTLdb>

ČESTR, Plemeno. www.cestr.cz. Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. 2008a [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.cestr.cz/plemeno.html>

ČESTR, Svaz. www.cestr.cz. Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. 2008b. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.cestr.cz/svaz.html>

ČESTR. Chovný cíl plemene. Svaz. www.cestr.cz: Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. 2012. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z:

http://www.cestr.cz/files/slechtenti_a_reprodukce/slechtitelsky_program_2007.pdf

Národní referenční středisko pro genetické zdroje zvířat, Genetické zdroje [online]. Praha – Uhřetíněves [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://www.genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/skot/narodni-program-skot-cesky-strakaty-skot/>

Seznam příloh a tabulek

Graf č. 1: Přehled stavů skotu v České republice

Graf č. 2 Přehled úrovně dojivosti v jednotlivých chovech (SAS 9.4)

Obrázek č. 1: Struktura chemokinového receptoru CXCR1 na povrchu neutrofilu

Obrázek č. 2 Vizualizace produktů PCR – RFLP

Obrázek č. 3 Schéma restričního štěpení CXCR1 C

Obrázek č. 4 Schéma restričního štěpení CXCR1 G

Tabulka č. 11 Přehled základních statistik souboru v závislosti na pořadí laktace

Tabulka č. 12 Složení PCR reakční směsi

Tabulka č. 13 Teplotní profil PCR reakce

Tabulka č. 14 Přehled komponent restričního štěpení

Tabulka č. 15 Frekvence genotypů pro CXCR1

Tabulka č. 6 Frekvence alel pro CXCR1

Tabulka č. 16 Přehled statisticky významných efektů pro dojivost

Tabulka č. 17 Přehled průměrné dojivosti podle genotypů během jednotlivých laktací

Tabulka č. 18 Přehled statisticky významných efektů pro skóre výskytu somatických buněk v mléce

Tabulka č. 19 Výskyt somatických buněk (SCS) podle genotypů během jednotlivých laktací

Tabulka č. 11: Přehled skórovaného výskytu SC za jednotlivé laktace podle farem. Zvýrazněny jsou nejvyšší pozorované hodnoty

Tabulka č. 12: Přehled dojivosti za jednotlivé laktace podle farem.

Tabulka č. 13: Přehled skórovaného výskytu SC a dojivosti za jednotlivé laktace podle otců dojnic.

Seznam použitých zkratek a symbolů

bp – páry bází (base pair)

C – cytosin

cM – centimorgan

CPM – celkový počet mikroorganismů

CXCR1 – chemokinový receptor 1

DAC – databáze genomických dat pro strakatý skot České republiky, Německa a Rakouska

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleotid acid)

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

ES – Evropské společenství: Evropský parlament a rada

EVF - Evropské sdružení chovatelů strakatého skotu (Europäische Vereinigung der Fleckviehzüchter)

G – guanin

GLM – obecný lineární model (generalized linear model)

GZW – celkový složený index (Gesamtzuchtwert)

Il - interleukin

LSCS – průměrné skóre somatických buněk za jednu laktaci (lactation average somatic cell score)

LSM – průměr nejmenších čtverců (least squares mean)

MAS – markery asistovaná selekce

MgCl₂ – chlorid hořečnatý PPP Master Mix

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

QTL – lokusy kvantitativních vlastností (quantitative trait loci)

RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)

SC – somatické buňky (somatic cells)

SCC – počet somatických buněk (somatic cells count)

SCS – skóre počtu somatických buněk (somatic cells score)

TBE - tris-borát-EDTA