

# ORGANIZAČNÍ POSTUPY PRO ODHALOVÁNÍ SKRYTÝCH PŘENAŠEČŮ GENETICKY PODMÍNĚNÝCH PORUCH ZDRAVÍ



## *Metodika*

Jindřich Čítek  
Václav Řehout  
Eva Hradecká  
Lenka Hanusová  
Libor Večerek



České Budějovice, 2008

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Zemědělská fakulta**

**Organizační postupy pro odhalování skrytých přenašečů  
geneticky podmíněných poruch zdraví**

Metodika zpracovaná v rámci řešení výzkumného záměru MSM 6007665806

**Trvale udržitelné způsoby hospodaření v horských a podhorských oblastech zaměřené  
na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním**

Věcný okruh 3

**Biotechnologie v multifunkčním zemědělství pro zdraví, produkční schopnosti, kvalitu a  
bezpečnost produktů zvířat a rostlin**

**Kolektiv autorů**

**doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.  
prof. Ing. Václav Řehout, CSc.  
Ing. Eva Hradecká, Ph.D.  
Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.  
Ing. Libor Večerek**

**České Budějovice, 2008**

**Oponenti:**

doc. Ing. mgr. Ivan Majzlík, CSc. - *ČZU Praha*

Prof. Dr. hab. Andrzej Filistowicz - *University of Life Sciences, Wrocław, Poland*

**Grafická a technická spolupráce:**

Martin Ochman

## OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Úvod</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>CVM</b>                                       | <b>2</b>  |
| <b>DUMPS</b>                                     | <b>3</b>  |
| <b>Bovinní citrulinemie</b>                      | <b>5</b>  |
| <b>BLAD</b>                                      | <b>6</b>  |
| <b>Glycogen storage disease V</b>                | <b>7</b>  |
| <b>Glycogen storage disease II</b>               | <b>7</b>  |
| <b>Materiál a metody</b>                         | <b>9</b>  |
| <i>Izolace DNA I. - periferní krev</i>           | 9         |
| <i>Izolace DNA II. - periferní krev</i>          | 9         |
| <i>Izolace DNA III. – sperma</i>                 | 10        |
| <b>Polymerázová řetězová reakce</b>              | <b>11</b> |
| <b>Použité primery měly tyto sekvence:</b>       | <b>13</b> |
| <i>BLAD</i>                                      | 14        |
| <i>DUMPS</i>                                     | 14        |
| <i>Citrulinemie</i>                              | 15        |
| <i>GSD V</i>                                     | 15        |
| <i>GSD II E7</i>                                 | 15        |
| <i>GSD II E9</i>                                 | 16        |
| <i>GSD II E13</i>                                | 16        |
| <b>Polymorfismus délky restričních fragmentů</b> | <b>16</b> |
| <b>Délky fragmentů u dědičných chorob</b>        | <b>18</b> |
| <i>BLAD</i>                                      | 18        |
| <i>DUMPS</i>                                     | 18        |
| <i>Citrulinemie</i>                              | 19        |
| <i>GSD V</i>                                     | 19        |
| <i>GSD II E7</i>                                 | 19        |
| <i>GSD II E9</i>                                 | 19        |
| <i>GSD II E13</i>                                | 20        |
| <b>Doporučení pro chovatelskou praxi</b>         | <b>23</b> |
| <b>Literatura</b>                                | <b>26</b> |

## Úvod

Dědičné choroby postihují všechny druhy a chovy domestikovaných zvířat. Tyto defekty vedou ke značným ekonomickým ztrátám při šlechtění. Identifikace, porozumění a eliminace těchto stavů by měla být zájmem všech, kteří se zvířaty pracují (Robinson, Shanks, 1990). Časná mortalita telat, která je dalším problémem, řešeným v tomto projektu, významně ovlivňuje celkovou efektivitu chovu.

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

V tomto kontextu by bylo prospěšné omezit inbreeding a zvýšit počet elitních býků používaných v umělé inseminaci, protože dlouhodobě závisí diverzita na příbuznosti mezi býky, kteří jsou používáni ve šlechtitelských programech. Pro ilustraci je možné uvést, že ve Spojených státech býci narození v letech 1998/99 byli příbuzní k populaci krav z 13,1% u ayrshirského plemene a 10,1% u holštýnského. Pět otců zplodilo 100% ayrshirských, 42% holštýnských, 71% guernseyských a 76% jerseykých býků. V zemích Interbull bylo v roce 1995 deset býků otci 54% ayrshirských, 43% holštýnských, 100% guernseyských a 66% jerseykých býků. Rovněž maternální diverzita je limitována, pět býků bylo otci 45% elitních ayrshirských amerických krav a 17% holštýnských (Weigel, 2001).

Pokud se zpětně ukáže, že rozsáhle užívaní elitní býci s velkým počtem potomků byli nositeli defektního genu, důsledky jsou velmi negativní, inbreeding v populaci tento proces intenzifikuje. To se stalo v případě posledního velkého genetického defektu, BLAD. Býkem, který byl téměř úplně odpovědným za jeho rozšíření v holštýnské populaci byl Carlin-M Ivanhoe Bell, jenž měl ve Spojených státech více než 79 000 dcer v oficiální kontrole užitkovosti a přes 1 200 synů s dcerami (Olson, 2002). Tentýž býk, Bell, byl také nositelem nového genetického defektu, CVM. Defektní gen BLAD dostal Bell od svého dědečka Osborndale Ivanhoe přes otce Pennstate Ivanhoe Star. Bylo zjištěno, že Ivanhoe Star byl rovněž heterozygotní pro CVM, pravděpodobně ji dostal od své matky. To znamená, že polovina potomků Bella byla heterozygotní pro BLAD a polovina pro CVM. Fenotypově se

začaly choroby projevovat po mnoha letech, když byli samčí potomci Bella připraveni na jeho potomky samičí.

Protože nové metodické přístupy a molekulární techniky jsou již řadu let používány také ve šlechtění tvířat, genetikové mají účinný nástroj k eradikaci dědičných poruch zdraví z populací. Chovatelé mohou kontrolovat svá stáda za předpokladu, že je k dispozici příslušná analytická metoda. Pro kontrolu dědičných recesivně podmíněných chorob ve šlechtitelských programech je klíčová detekce fenotypově normálních heterozygotních přenašečů. Znalost genetických defektů na molekulární bázi umožňuje přímou detekci nosičů na úrovni DNA brzo po narození, nebo již studiem embryonálních buněk (Harlizius *et al.*, 1996).

V literárním přehledu jsou krátce popsány dědičné poruchy zdraví, s nimiž je možno počítat jako s rizikovými v populaci skotu v ČR.

## **CVM**

**Komplex vertebrálních malformací (CVM)** byl poprvé popsán v Dánsku v říjnu 2000 u holštýnských telat. V létě 2001 vědci na Dánském Institutu Zemědělských věd identifikovali gen a mutaci, zodpovědné za tuto chorobu. Defekt byl zpětně vystopován k americkému vynikajícímu plemeníkovi Carlin-M Ivanhoe Bell. Bell byl předtím jako otec užíván po celém světě a celkový dopad na mortalitu holštýnských telat byl značný (Konersmann, 2002, Konersmann *et al.*, 2003). Posléze bylo zjištěno, že nositelem byl již jeho otec Penstate Ivanhoe Star USA 1441440, nar.20.1.1963.

Defekt způsobuje mutace v autozomálně recesivním genu (Revell, 2001, Bendixen, 2001a, <http://www.naab-css.org/education/CVMpressrealse-D.html>, Snoj, 2002). Telata postižená CVM se mohou narodit tehdy, je-li matka nosička připuštěna otcem rovněž přenašečem. Pokud jsou tedy rodiči oba nosiči, pak je 75% telat normálních a 25% CVM postižených. Telata, která nesou defektní gen, jsou po tělesné stránce v pořádku a jejich produkce není postižena, ale jsou CVM nosiči. Zvířata, která jsou identifikována jako přenašeči jsou označena kódem „CV“ ve všech rodokmenech a podobných dokladech o původu, geneticky zdraví jedinci jsou označeni kódem „TV“. Tyto kódy jsou mezinárodně uznávané a standardizované (<http://www.naab-css.org/education/CVMpressrelease-D.html>, Grzybowski, 2003).

Typické znaky CVM jsou zkrácený krk a přední končetiny, bilaterální, symetrické, mírné stažení zápěstních kloubů, vážné zkrácení a mírná laterální rotace nártových spojů. Zadní končetiny vykazují bilaterální, symetrické kontrakce nártových kloubů s mediální rotací zadních nohou. U všech končetin bylo pozorováno prodloužení nártu. Vertebrální abnormality zahrnují fúzi posledních dvou krčních obratlů a distorzi prvních tří hrudních obratlů, což vede v tomto místě k mírné skolióze. Vyšetření srdce ukázalo pravostrannou hypertrofii a defekt horního mezikomorového septa. Aorta i plicní tepna vychází z pravé strany srdce. Srdeční abnormality se vyskytují u 50% případů (Revell, 2001, Pazdera, 2001, Agerholm *et al.*, 2001). Bendixen (2001b) uvádí, že více než 63 000 krav se sníženou plodností vykazovalo významně často postižení plodu CVM. Řada CVM plodů je potracena v 159. dni gestace, jiná CVM telata se narodí předčasně a zpravidla brzo po porodu umírají (Agerholm *et al.*, 2001). Je-li plod homozygotní pro CVM, 29% krav potratí do 100. dne březosti, 45% ve 150. dni a 77% potratů je zaznamenáno 260. den (Nielsen *et al.*, 2003).

Molekulární vyšetření tohoto defektu je založeno na molekulárně - genetických metodách. Identifikace CVM přenašeče je založena na detekci genetických markerů. CVM postižený gen je testován užitím markeru, který je situován blízko CVM genu (Pazdera, 2001). Býk Carlin-M Ivanhoe Bell a jeho potomci byli využíváni v řadě zemí a také v České republice. Dosud bylo potvrzeno 74 plemenů jako nositelé CVM malformací (např. Jabot, Etazon Lord Lily, KOL Nixon, T Klassy, NJY Hubert, Tornado etc.) Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR vydává listinu plemenů, na nichž jsou zapsáni nositelé CVM faktoru.

## **DUMPS**

*Deficiencie uridin-5'- monofosfát syntázy (DUMPS)* je genetická porucha, která ovlivňuje biosyntézu pyrimidinu a je děděna jako jednoduchý, dvoualelový lokus na autozómu (Shanks, Greiner, 1992, Kuhn, Shanks, 1994). Enzym uridin-5'-monofosfát (UMP) syntáza katalyzuje přeměnu orotické kyseliny na UMP, což je prekurzor všech dalších pyrimidinových nukleotidů a běžná složka mléka krav a dalších přežvýkavců (Shanks, Robinson, 1989, Shanks *et al.* 1989). Dědičná deficiencie tohoto enzymu je známa i u člověka jako autozomálně recesivní vlastnost, tzv. *dědičná orotická acidurie*. DUMPS byl dále pozorován u dojného skotu, a to zejména v USA u holštýnsko-fríského plemene (Shanks *et*

*al.*, 1987, Shanks, Robinson, 1989). Některé krávy ze stáda Univerzity v Illinois produkovaly mléko s pět až desetkrát vyšší koncentrací kyseliny orotické, než je běžné. Tyto hladiny orotické kyseliny v mléce byly evidentní v různých stádiích laktace a přetrvávaly od jedné laktace ke druhé. Kyselina se také vylučovala do moči a krve laktujících zvířat. Někteří autoři následně došli k závěru, že byl-li enzym UMP syntáza deficientní, docházelo k akumulaci kyseliny orotické (Robinson, Shanks, 1990).

UMP syntáza je nutná pro de novo syntézu pyrimidinových nukleotidů, které jsou stavebními kameny DNA a RNA, růst a vývoj homozygotně recesivních jedinců je tudíž zastaven a vede k embryonální mortalitě okolo 40. dne gestace (Shanks, Robinson, 1990, Robinson *et al.*, 1993). Heterozygotní nosiči nesou defektní alelu zvanou DUMPS (Harzilius *et al.*, 1996).

V průměru polovina potomků z křížení mezi heterozygotním a normálním (geneticky zdravým) rodičem je normální, další polovina potomků představuje nosiče. Heterozygotní nosiči poruchy jsou běžně identifikováni měřením aktivity enzymu UMP syntázy v erytrocytech, játrech, slezině, ledvinách, svalech a mléčné žláze, přičemž tato aktivita je u nositelů snížena (Shanks, 1990) a je redukována na polovinu normálních hladin (Schwenger *et al.*, 1994, Robinson, Shanks, 1990).

Praktickým dopadem tohoto defektu je to, že krávy přenašečky vykazují vyšší četnost dřívějšího přeběhnutí se, protože jejich březost je ukončena časným spontánním abortem (Fries, Ruvinsky, 1999).

V současnosti je již známa struktura genu pro UMP syntázu a také test na přenašeče, založený na PCR diagnostice. DUMPS způsobuje bodová mutace (C - T) na kodonu 405 v exonu 5 (Viana *et al.*, 1998). Gen pro UMP syntázu byl v bovinním genomu lokalizován na chromozomu 1 (q31-36) (Harzilius *et al.*, 1996).

Možný postup při odhalení recesivní alely (Schwenger *et al.*, 1993, Grzybowski *et al.*, 1998) je následující. Produkt zahrnující mutaci měří 108bp, byl amplifikován z genomické DNA za použití primerů 5' CAA ATG GCT GAA GAA CAT TCT G 3' a 5' GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3'. Po denaturaci 94° C 5min. následovalo 35 cyklů PCR (94° C 1 min, 60° C 1 min., 72° C 30 sec) a konečná elongace produktu (72° C 5 min.) PCR produkt byl štěpen restriktázou *Ava I* 1,5 hod. při 37° C. Výsledné fragmenty byly analyzovány na agarózovém gelu.

Označení „DP“ je přiřazeno ke jménu známého heterozygota přenašeče a uváděno



v oficiálních rodokmenech, geneticky zdravá zvířata nesou označení „TD“ (Shanks, Robinson, 1990).

## **Bovinní citrulinemie**

*Citrulinemie* je autozomálně recesivně podmíněná porucha metabolismu močoviny, charakterizována vysokými hladinami citrulinu a, mnohem vážnějším, obsahem amoniaku v plazmě. Příčinou je deficece aktivity jednoho z enzymů ornitinového cyklu, argininsukcinátsyntázy (ASS). Bovinní citrulinemie je způsobena tranzicí cytosin-tymin na kodónu 86 uvnitř exonu 5, v genu kódujícím ASS (Padeeri *et al.*, 1999). Normální bovinní ASS je peptid o 412 aminokyselinách ([www.angis.org.au](http://www.angis.org.au)). Tato porucha byla prvně popsána u člověka, následně u psů a byla pozorována také u fríských telat (Healy *et al.*, 1990, [www.angis.org.au](http://www.angis.org.au), Viana *et al.*, 1998). Postižená (homozygotní) telata jsou neschopná vylučování amoniaku a jeví neurologické symptomy, které se neustále zhoršují a vedou ke smrti do týdne po narození (Grupe *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 2001). Lokus pro ASS je u skotu lokalizován an 11. chromozómu (BovMap).

Amplifikace lokusu pro ASS a detekce mutace na kodónu 86 byla prováděna metodou PCR/RFLP. PCR reakce obsahovala 5' TTC CTG GGA CCC CAG GGA CCG TGT TCA TTG AGG ACA TC 3' a 5' TTC CTG GGA CCC CGT GAG ACA CAT ACT TG 3' primery. Izolovaná DNA byla amplifikována 30 cyklů (94 ° C 30 sec, 55° C 30 sec, 72° C 30 sec) s konečnou elongací produktu 72° C 10 min. Amplifikované produkty byly štěpeny restriktázou *Ava II* po dobu tří hodin a analyzovány na 3% agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromide (Padeeri *et al.*, 1999). Po digesci ukazoval PCR produkt homozygotně normálních jedinců jeden 100bp proužek, heterozygotní PCR produkt dva proužky, 100 a 200bp a postižená telata pouze 200bp proužek ([www.angis.org.au](http://www.angis.org.au)).

## **BLAD**

*Deficience bovinní leukocytární adheze* (BLAD), je letální autozomálně recesivní onemocnění u holštýnského skotu, charakterizované silně sníženou hladinou exprese  $\beta 2$  heterodimerického integrinu. Integriny jsou adhezivní molekuly, které zprostředkovávají

vstup a přechod neutrofilů přes membrány a zničení vniknuvších patogenů (Kehrli *et al.*, 1992, Poli *et al.*, 1996, Natonek, 2000).  $\beta 2$  integriny jsou Světovou zdravotnickou organizací klasifikovány jako CD11/CD18 podle svých  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. Jsou složeny z identických  $\beta$  podjednotek (CD18) a strukturálně variabilních  $\alpha$  podjednotek, značených jako CD11a, CD11b a CD11c pro integriny LFA-1, Mac-1 a p150, 95. Protože exprese  $\beta 2$  integrinů vyžaduje intracelulární asociaci CD11 a CD18 podjednotek, brání defekty v CD18 expresi všech  $\beta 2$  integrinů. U neutrofilů izolovaných z telat postižených BLAD byla pozorována snížená exprese leukocytárních integrinů na povrchu buněk, snížená schopnost agregace v reakci na chemotaktické stimuly a snížená schopnost migrace přes monolayer bovinních endoteliálních buněk (Pareek, Kaminski, 1996).

Defektní leukocytární adherence vede k neadekvátní imunitě sliznic a nemocná zvířata mají vážné a opakované slizniční infekce, jako je pneumonie, ulcerativní záněty dásní, záněty ozubice, papilomatosi, dermatofytosis, vypadávání zubů, tvorba hnisu, pomalé hojení ran a omezený růst (Nagahata *et al.*, 1993, 1994, 1997, Ackermann *et al.*, 1996, Ribeiro *et al.*, 2000).

Výsledky krevních testů od postižených telat ukázaly přetrvávající zřetelnou leukocytózu s převahou segmentovaných neutrofilů. Migrace neutrofilů a síla chemotaktické odpovědi byly významně sníženy. Adherentní aktivita a fagocytóza kvasinek byly rovněž značně omezené, což je důkazem, že schopnost neutrofilů fagocytovat je spojena s C3b receptorem. Markantně snížené množství CD18 na povrchu neutrofilů BLAD telat bylo prokázáno fluorescenčními histogramy (Nagahata *et al.*, 1994). Gourreau *et al.* (1998a) spojuje s BLAD hypoalbuminémii a hyperglobulinémii, hypoglykémie je rovněž častá. Jorgensen, Madsen (1997) pozorovali horší schopnost využití potravy, tendenci k pomalejšímu růstu a nižší schopnost odpovídat na léčbu onemocnění. Další pozorování ukázala, že BL/TL krávy (tj. nositelky BLAD mutace), produkují více mléka během první laktace a více mléčného proteinu než jejich zdravé polosestry (Lubieniecki *et al.*, 1999).

Molekulární povaha BLAD je jednoduchá bodová mutace (A-G) na pozici 383 v cDNA na genu CD18 na chromozómu 1. Tato mutace vede k záměně glycinu za aspartamovou kyselinu na pozici 128 v proteinu D128G (Shuster *et al.*, 1992, Jorgensen *et al.*, 1993, Gerardi, 1996, Rutten *et al.*, 1996, Meylan *et al.*, 1997). Viana *et al.*, (1998) a Shuster *et al.*, (1992) popsali existenci tiché bodové mutace (C-T) na pozici 775 v cDNA bez fenotypové manifestace. DNA studie s užitím restrikčních endonukleáz *Taq I* nebo *Hae III* detekovaly rozdíly mezi zdravými a postiženými telaty. Gerardi (1996) pozoroval po štěpení

restriktázami u zdravých zvířat 100, 200 a 300bp proužky a u BLAD nemocných telat proužky o délce 200 a 400bp. Viana *et al.* (1998) popsal délku fragmentů u normálních zvířat 191 a 152bp, u heterozygotních přenašečů 343, 191 a 152bp a u nemocných homozygotů pouze jeden proužek 343bp. Heterozygot je zdravý, ale má fragmenty všech délek a je tedy nosič choroby s normálním i abnormálním chromozomem.

Kód pro BLAD nosiče je „BL“, pro zvířata bez BLAD alely „TL“ (Tainturier *et al.*, 1995, Powell *et al.*, 1996, Simon *et al.*, 1998, Gourreau *et al.*, 1998a,b).

Amplifikační reakce pro DNA vzorky pracuje s primery 5'CCC TGC CAG TCC AGC TGG ACA CC 3' a 5' CCA CGC CCA TCA TTC TGG GGC AG 3'. Amplifikovaný produkt lze štípat restriktázou *Taq I* nebo *Hae III* po dobu tří hodin na 37° C, analyzuje se na agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid (Viana *et al.*, 1998, Ribeiro *et al.*, 2000).

### **Glycogen storage disease V**

***Glycogen storage disease V*** (GSD V) je také známa jako deficiencie svalové glykogen fosforylázy nebo myofosforyláza. Jde o svalovou chorobu, která je způsobena bodovou mutací příslušného genu (Tsujino *et al.*, 1996, Soethout *et al.*, 2002). Způsobuje zátěžovou intoleranci, myalgii a opakovanou myoglobinurii. Porucha byla poprvé popsána Angelosem *et al.* (1995) s monogenní autosomálně recesivní dědičností. U člověka je defekt znám jako McArdle's disease s podobnými symptomy. V poslední době se otázkou glycogen storage disease na Novém Zélandu zabýval Johnstone *et al.* (2004).

### **Glycogen storage disease II**

***Glycogen storage disease II*** (GSD II) je zapříčiněna mutantními alelami genu kyselé  $\alpha$ -glukosidázy, které způsobují ztrátu funkce. AAG (acidic  $\alpha$ -glukosidase) je lysosomální enzym, katabolizující glykogen na glukózu, deficiencie jeho aktivity má za následek generalizovanou glykogenózu (glycogen storage disease II, Pompe's disease) u člověka, ovce, psa, kočky, křepelky a skotu (Dennis *et al.*, 2002). Dědičnost je autozomálně recesivní. U skotu postiženého glykogenózou nastává úhyn do 12 měsíců věku. V genu pro AAG se vyskytuje několik mutací s různým efektem. Letální mutace E7 je delece dinukleotidu

v exonu 7 (1057 $\Delta$ TA) způsobující frameshift. Letální mutace E13 je tranzice cytozinu na tymin v exonu 13 (1783C-T), způsobující vznik stop kodonu v exonech 8 a 13. Bylo popsáno několik dalších mutací, E9 je tranzice v exonu 9 (1351C-T) je zodpovědná za 70-80% redukcii aktivity AAG, 2454 $\Delta$ CA (Dennis, Healy, 2001) je letální mutace popsaná u shorthornského skotu, *MspI* polymorfismus je tichá mutace v exonu 16 (2223G-A).

Závěrem krátké literární rešerše těch dědičných poruch zdraví, které jsou předmětem navržené metodiky lze konstatovat, že recesivně děděné poruchy u skotu mají sice velmi nízkou incidenci, ale v některých případech může jejich výskyt vážně narušit ekonomiku a plynulý průběh šlechtění. Rychlé šíření genetických defektů, jako např. CVM nebo BLAD v poslední době bylo zapříčiněno zejména intenzivním používáním malého počtu vynikajících plemenů, kteří byli latentními heterozygotními přenašeči mutace. Zejména populace holštýnského skotu je k rychlému šíření geneticky podmíněných defektů velmi náchylná. Seleční tlak je zde velmi silný a přesto, že samičí populace je velmi početná, v důsledku nízkého počtu elitních býků jde o populaci geneticky malou. Umělá inseminace pak celosvětovému rozšíření poruch výrazně napomohla. Možný vznik stále nových defektů (např. CVM) je dán vlastnostmi DNA. V současnosti však umožňují molekulárně - genetické metody účinnou prevenci v šíření patologických alel, a to včasnou diagnostikou a eliminací býků, kteří mutovaný gen přenášejí.

## **Materiál a metody**

Pro analýzu je potřeba řada laboratorních metod. V první řadě se jedná o izolaci DNA z vhodného materiálu, v našem případě periferní krve nebo spermatu - inseminačních dávek. Pro identifikaci patologických recesivních alel je nejčastěji používána metoda amplifikace příslušného lokusu v polymerázové řetězové reakci s následnou analýzou polymorfismu délky restričních fragmentů pomocí restriční endonukleázy.

Dále jsou přehledně uvedeny příslušné laboratorní metody pro vybrané dědičné poruchy zdraví.

### **Izolace DNA I. - periferní krev**

1. den

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

2. den

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

### **Izolace DNA II. - periferní krev**

Lze použít pouze neheparinizovanou krev.

50 $\mu$ l krve + EDTA se smíchá s 500 $\mu$ l TE pufru, odstředí se při 14 000 rpm, TE pufr se odsaje, převrství čerstvým TE pufrém, důkladně se roztřepe peleta leukocytů a opět centrifuguje,

opakuje se 3x do vyčištění. Čistá peleta se převrství v 1,5ml eppendorfce 100 $\mu$ l lyzačního pufru s PK (viz dále), nechá se inkubovat při 54°C přes noc, ráno se opatrně promíchá špičkou a používá se v PCR (práce s lyzáty pro PCR viz metodika PCR/RFLP složení mixu).

Lyzační pufr (zásobní roztok, uchovávat v ledničce):

- 20 ml TRIS
- 50 ml 1M KCl
- 2,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>
- 5 ml Tween 20 (detergent)
- doplnit do 100 ml H<sub>2</sub>O

Před použitím se 10x ředí.

Proteináza K (PK) (zásobní roztok, zmrazit):

- 100 mg PK (Serva)
- 5 ml H<sub>2</sub>O

Výsledná koncentrace PK v lyzačním pufru je 100 $\mu$ g/ml.

Pro izolaci DNA z krve je možné rovněž použít komerčně nabízené kity různých firem.

### **Izolace DNA III. - sperma**

1. den

Obsah pejetý se resuspenduje v 1 ml PBS pufru a centrifuguje 6min/10000rpm, PBS se odsaje, nahradí čerstvým, opakuje se 4x do vyčištění.

K sedimentu se přidá: 200 $\mu$ l PBS

800 $\mu$ l roztoku 3 (0,6g TRIS, 2,9g NaCl, 0,4g NaOH, doplnit do 0,5l  
redestilovanou vodou)

16 $\mu$ l merkptoethanolu

Inkubuje se 30 min na vodní lázni při 50°C. Přidá se 50 $\mu$ l PK (25mg/1ml), inkubuje se přes noc v termostatu při 37°C.

2. den

Nejprve se každý vzorek rozdělí do dvou označených zkumavek (1,5 ml), následná extrakce pak probíhá paralelně.

Extrakce chloroformem I: eppendorfka se naplní, 6 min. se důkladně protřepává, centrifuguje se 7 min/12000rpm při 25°C, vzorek se přepipetuje do čistých zkumavek a proces se opakuje.

Extrakce chloroformem II: opět se přidá chloroform a třepe 6 min, centrifugace při 15°C 5min/6000 rpm, opakuje se 2x.

Po závěrečném přepipetování vzorku do čisté označené eppendorfky se sráží DNA přídatkem 0,5 ml vychlazeného 100% EtOH + CH<sub>3</sub>COONa (9 dílů alkoholu, 1 díl octanu).

Centrifuguje se 3 min/14000rpm, odsaje se, peleta se promyje 70% EtOH, odsaje se alkohol, nechá se vyschnout a převrství TE pufrem jako u izolace DNA z plné krve.

### **Polymerázová řetězová reakce**

Jedná se o klonaci (množení) DNA, prováděnou in vitro. Velmi stručně lze PCR popsat jako denaturaci DNA, při které se uvolní vodíkové můstky a oddělí komplementární vlákna, připojení primerů (oligonukleotidových oček) na komplementární úseky DNA a syntézu nového řetězce DNA. Tento cyklus se opakuje, v každém se zdvojnásobí počet kopií příslušného úseku DNA. Složení reakční směsi pro analýzu jednotlivých lokusů je uvedeno v tabulce:

**Tab 1. Složení mixu PCR**

| Komponent              | BLAD |         | DUMPS |       | Citruinemie |       | GSD V |       | GSD II E7 |       | GSD II E9 |       | GSD II E13 |       |
|------------------------|------|---------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-----------|-------|-----------|-------|------------|-------|
|                        | DNA* | Lyzát** | DNA   | Lyzát | DNA         | Lyzát | DNA   | Lyzát | DNA       | Lyzát | DNA       | Lyzát | DNA        | Lyzát |
| 10x PCR pufr           | 2    | 2       | 2     | 2     | 2           | 2     | 2     | 2     | 2         | 2     | 2         | 2     | 2          | 2     |
| MgCl <sub>2</sub>      | 2,4  | 2,4     | 1,2   | 1,2   | 1,2         | 1,2   | 0,8   | 0,8   | 1         | 1     | 0,8       | 0,8   | 1          | 1     |
| dNTP's                 | 2    | 2       | 2     | 2     | 2           | 2     | 2     | 2     | 2         | 2     | 2         | 2     | 2          | 2     |
| Primer 1***            | 1    | 1       | 1     | 1     | 1           | 1     | 1     | 1     | 0,8       | 0,8   | 1         | 1     | 1          | 1     |
| Primer 2               | 1    | 1       | 1     | 1     | 1           | 1     | 1     | 1     | 0,8       | 0,8   | 1         | 1     | 1          | 1     |
| DNA                    | 1,3  | 1,3     | 1,3   | 1,3   | 1,3         | 1,3   | 1,3   | 1,3   | 1,3       | 1,3   | 1,3       | 1,3   | 1,3        | 1,3   |
| Taq polymeráza*<br>*** | 0,2  | 2       | 0,2   | 0,2   | 0,2         | 0,2   | 0,2   | 2     | 0,2       | 2     | 0,2       | 2     | 0,2        | 2     |
| H <sub>2</sub> O       | 10,1 | 8,3     | 11,3  | 11,3  | 11,3        | 11,3  | 11,7  | 9,9   | 11,9      | 10,1  | 11,7      | 9,9   | 11,5       | 9,7   |

\* čištěná DNA připravená metodou izolace I. chloroformem z plné krve

\*\* DNA v lyzátu připraveném metodou II.

\*\*\* množství oligo 10 pmol

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



**Použité primery měly tyto sekvence:**

BLAD 1

5'GTC AGG CAG TTG CGT TCA A 3'

BLAD 2

5'GAG GTC ATC CAC CAT CGA GT 3'

DUMPS 1

5'GCA AAT GGC TGA AGA ACA TTC TG 3'

DUMPS 2

5'GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT 3'

CITR 1

5'GTG TTC ATT GAG GAC ATC 3'

CITR 2

5'CCG TGA GAC ACA TAC TTG 3'

GSD V 1

5'-CCA GGA AGA CCC TCA TTC CA-3'

GSD V 2

5'-AGG GAA ACA CAC ACA CAG-3'

GSD II E13 1

ACT GCC CTG CAC TCT TGC CGG CCG T

GSD II E13 2

GGA AAG CTG CTC CCG GTC GCT CC

GSD II E9 1

GGG ACC TAC CGA CCC TAC GAC GAG CCT CTG AGG

GSD II E9 2

GTC AGA AGC CAC TAT AAC C

GSD II E7 1

GGA CGT GTA CAT CTT CTT GG

GSD II E7 2

GTC ATA TTC TCC ACG ACC

Dále je uveden teplotní režim pro amplifikaci jednotlivých lokusů. Amplifikace byla prováděna na termálním cykleru Biometra Termogradient.

### **BLAD**

Víčko 104°C

94°C 3 min (pre-denaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 30 sec }  
61°C 30 sec } 35 cyklů

72°C 30 sec

72°C 5 min (finální elongace)

### **DUMPS**

Víčko 104°C

94°C 5 min (pre-denaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 1 min }  
61°C 1 min } 35 cyklů

72°C 30 sec

72°C 5 min (finální elongace)

## **Citrulinemie**

Víčko 104°C

94°C 5 min (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 45 sec }  
61°C 45 sec } 35 cyklů

72°C 45 sec

72°C 4 min (finální elongace)

## **GSD V**

Víčko 104°C

94°C 5 min (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 1 min }  
61°C 1 min } 35 cyklů

72°C 1 min

72°C 4 min (finální elongace)

## **GSD II E7**

Víčko 104°C

94°C 5 min (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 1 min }  
54°C 1 min } 35 cyklů

72°C 1 min

72°C 4 min (finální elongace)

## **GSD II E9**

Víčko 104°C

94°C 5 min (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 1 min }  
62°C 1 min } 35 cyklů

72°C 1 min

72°C 4 min (finální elongace)

## **GSD II E13**

Víčko 104°C

94°C 5 min (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza – viz výše).

94°C 1 min }  
59°C 1 min } 35 cyklů

72°C 1 min

72°C 4 min (finální elongace)

## **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů**

Po PCR jsou amplifikované úseky genu nesoucí příslušnou mutaci analyzovány restrikčním štěpením za podmínek uvedených v tabulce:



Fragmenty jsou vizualizovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem a genotypizovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm.

### **Délky fragmentů u dědičných chorob**

#### **BLAD**

RE: *Taq I*

TL: 52+32+17

BL/TL: 84+52+32+17

BL: 84+17

RE: *Hae III*

TL: 65+36

BL/TL: 65+46+36+19

BL: 46+36+19

#### **DUMPS**

RE: *Ava I*

TD: 53+36+19

DP: 89+53+36+19

**(hypoteticky recesivní homozygot): 89+19**

### **Citrulinemie**

RE: *Ava II*

**dominantní homozygot (zdravý):** 99+78

**heterozygot (přenašeč):** 177+99+78

**recesivní homozygot (postižený):** 177

### **Glycogen storage disease V**

RE: *StyI*

**dominantní homozygot (zdravý):** 252

**heterozygot (přenašeč):** 252+133+119

**recesivní homozygot (postižený):** 133+119

### **Glycogen storage disease II E7**

RE: *BglI*

**dominantní homozygot (zdravý):** 190+48

**heterozygot (přenašeč):** 190+161+48+27

**recesivní homozygot (postižený):** 161+27

### **Glycogen storage disease II E9**

RE: *BglI*

**dominantní homozygot (zdravý):** 81+68+30

**heterozygot (přenašeč):** 98+81+68+30

**recesivní homozygot (postižený):** 98+81

## **Glycogen storage disease II E13**

RE: *BsiEI*

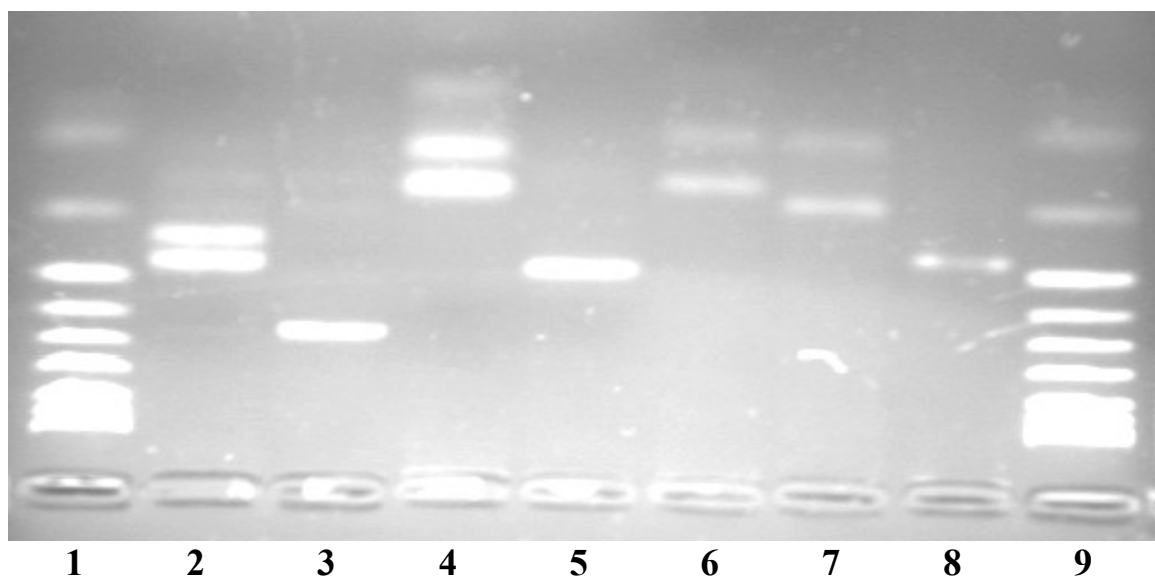
**dominantní homozygot (zdravý):** 116+39+22+15

**heterozygot (přenašeč):** 155+116+39+22+15

**recesivní homozygot (postižený):** 155+22+15

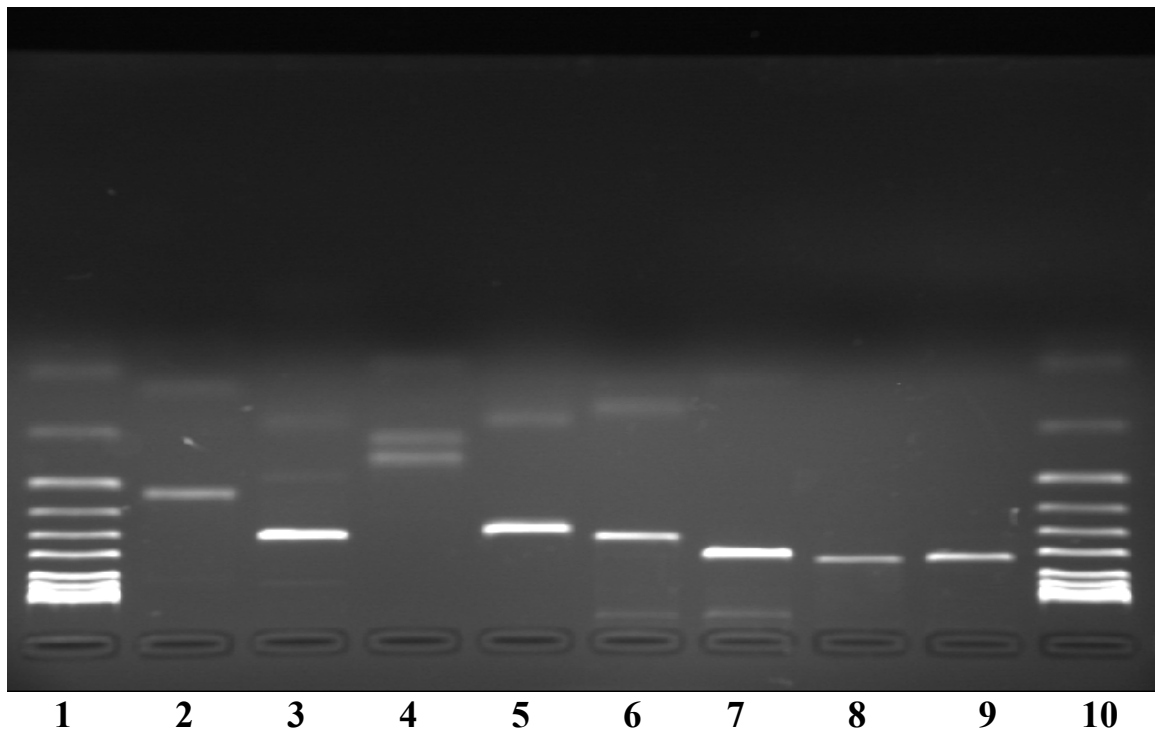


**Obr. 1 Genotypizace lokusů pro BLAD, DUMPS a citrulinemii**



1. velikostní marker pUC19/*HaeIII*, 2. RFLP citrulinemie (dominantní homozygot), 3. PCR produkt citrulinemie, 4. RFLP DUMPS (TD), 5. PCR produkt DUMPS, 6. RFLP *TaqI* BLAD (TL), 7. RFLP *HaeIII* BLAD (TL), 8. PCR produkt BLAD, 9. velikostní marker pUC19/*HaeIII*

**Obr. 2 Genotypizace lokusů pro glycogen storage disease II  
a glycogen storage disease V**



1. velikostní marker pUC19/*MspI*, 2. RFLP GSD II E13 (dominantní homozygot), 3. PCR produkt GSD II E13, 4. RFLP GSD II E9, 5. PCR produkt GSD II E9, 6. RFLP GSD II E7, 7. PCR produkt GSD II E7, 8. RFLP GSD V, 9. PCR produkt GSD V, 10. velikostní marker pUC19/*MspI*

## Doporučení pro chovatelskou praxi

Výskyt letálních recesivních dědičných poruch zdraví je většinou sporadický. U hospodářských zvířat je však možné, že dojde k dlouhodobému latentnímu šíření heterozygotními přenašeči, k postupnému zvýšení frekvence alely v populaci a vyštěpování recesivních homozygotů. Důsledkem je nutnost přijímat chovatelská opatření k potlačení dědičné poruchy zdraví, musí být vyřazována heterozygotní zvířata, dochází k chovatelským a ekonomickým ztrátám. Proces latentního šíření recesivních alel je u skotu pochopitelně výrazně usnadněn inseminací, intenzivním využíváním malého počtu špičkových býků a rozsáhlým mezinárodním obchodem s plemenným materiálem, zejména s konzervovaným spermatem. Příkladem celosvětového rozšíření dědičné choroby z nedávné doby je BLAD, nebo v současné době problém komplexu vertebrálních malformací. V praktickém šlechtění je proto nezbytné věnovat problematice dědičných poruch zdraví potřebnou pozornost.

Na základě výsledků, získaných dosud při řešení výzkumného záměru lze pro populaci skotu v České republice formulovat následující praktická chovatelská doporučení:

V populaci černostrakatého skotu chovaného v ČR a českého strakatého skotu je situace ohledně výskytu BLAD, DUMPS a citrulinémie dobrá (Čítek et al., 2006, 2008a). Je však žádoucí pokračovat v kontrole BLAD v populaci černostrakatého skotu a vyřazovat býky heterozygotní přenašeče, pokud se ještě vyskytnou. Pokračovat v kontrole BLAD je potřebné zejména s ohledem na to, že výskyt této poruchy v 90. letech byl také v České republice značný a v běžné populaci se recesivní alela v určité frekvenci vyskytuje. Připouštění býků s prokázaným homozygotně dominantním genotypem jednak zamezuje fenotypové manifestaci choroby a následným ztrátám úhynem, jednak snižuje frekvenci recesivní alely v populaci. Běžná kontrola citrulinémie a DUMPS není nutná.

Nezbytná je systematická kontrola výskytu CVM u černostrakatého plemene, neboť tato porucha představuje v současnosti nejzávažnější problém v genetice zdraví skotu (Čítek et al., 2008a). Naše opakovaná sledování prokázala, že výskyt heterozygotních býků (CV) od roku 2001 poklesl z původních 20% na současných cca 8%, avšak frekvence heterozygotů v elitní části samičí populace (matky býků, potenciální matky býků) je stále 20-23%. To jsou značně vysoké frekvence uvážíme-li skutečnost, že je již řadu let v platnosti program, jehož cílem je snížit výskyt CVM v populaci černostrakatého skotu v ČR. Přetrvávající vysoký výskyt CV

plemenných býků a krav je způsoben zejména tím, že v reprodukci jsou vědomě používáni heterozygotní býci, což je z hlediska řízení genetického zdraví v populaci nežádoucí.

Pokud chce šlechtitel získat potomstvo vynikajícího pleménika, heterozygotního přenašeče CVM, je možné provést odběr embryí po takovém otci, jejich genotypizaci a následně přenést pouze ta, která nejsou heterozygoty, event. je možné genotypizovat narozená telata a použít v chovu pouze negativní jedince. Použití heterozygotních pleméniků v běžné populaci krav je zásadně nežádoucí, neboť polovina potomků je opět heterozygotní a recesivní alela pro CVM se tak v populaci stále udržuje.

Byl zjištěn pouze sporadický výskyt deficience faktoru XI v populaci černostrakatého skotu (Čítek et al., 2008b), její systematickou kontrolu nepovažujeme za nutnou. V zahraničí byl však u některých linií zjištěn poměrně vysoký výskyt, u dovezených zvířat může naše pracoviště v případě potřeby provést genotypizaci a zjistit, zda pleménik je homozygot dominantní, nebo heterozygot.

Ve vzorku populace masných plemen skotu nebyl zjištěn výskyt recesivních alel. Nebyl zachycen ani výskyt glycogen storage disease V u charolaiského skotu, u něž byl popsán zahraničními autory (Čítek et al., 2007). V případě potřeby analyzovat jedince, kteří by vykazovali symptomy glycogen storage disease V, jejich rodiče nebo další zvířata podezřelá z přenašečství recesivní alely, může naše pracoviště ve spolupráci s chovateli a Svazem chovatelů masného skotu tuto analýzu provést.

Monitoring dědičných poruch zdraví je účelné zaměřit na ty, které se vyskytují specificky u určitého plemene. Tato zásada umožňuje podstatně snížit náklady na kontrolu genetického zdraví v populaci skotu.

Genotypizace elitních plemenic přispívá ke kontrole genetického zdraví populace, umožňuje rychlejší snížení frekvence nežádoucí recesivní alely v populaci. Je-li znám genotyp obou rodičů, není potom nutné provádět genotypizaci jejich potomků. Genotypizace jedné plemence tedy může ušetřit náklady na opakovanou genotypizaci několika jejích potomků.

Molekulárně genetické metody, umožňující odhalení heterozygotů jsou významným nástrojem, který umožňuje rychlé zlepšení genetického zdraví populace.

S výsledky byly seznámeny šlechtitelské firmy. Chovatelé byli seznámeni s tím, že uvedené dědičné poruchy zdraví mohou být genotypizovány na řešitelském pracovišti –

katedře genetiky a šlechtění zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

## Literatura

- Ackermann M. R., Kehrli M. E., Laufer J. A., Nusz L. T. (1996): Alimentary and Respiratory Tract Lesions in Eight Medically Fragile Holstein Cattle with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). *Vet. Pathol.*, 33 (3), 273-281.
- Agerholm J. S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J. (2001): Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 283-289.
- Angelos S., Valberg S.J., Smith B.P., McQuarrie P.S., Shanske S., Tsujino S., DiMauro S., Cardinet G.H. (1995): Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related Charolais cattle. *Muscle Nerve*, 18, 736-740.
- Azzam, S. M., Kinder, J. E., Nielsen, M. K. Werth, L. A., Gregory, K. E., Cundiff, L. V. and Koch, R. M. (1993): Environmental Effects on Neonatal Mortality of Beef Calves. *J. Anim. Sci.* 71:282 – 290.
- Bendixen C. (2001a): The CVM – mutation is not restricted to descendants of the American Holstein Friesian bull– Carlin-M Ivanhoe Bell. <http://www.cattle.dk/holstein/pres0111.htm>
- Bendixen C. (2001b): Danish scientists reveal the gene responsible for CVM, a lethal heritable defect in Holstein Cattle. <http://www.lr.dk/Kvaeg/diverse/PRESS-uk.htm>
- Berger, P. J., Cubas, A. C., Koehler, K. J. and Healey, M. H. (1992): Factors Affecting Dystocia and Early Calf Mortality in Angus Cows and Heifers. *J. Anim. Sci.* 70 (6): 1775 – 86.
- Berglund, B. (1996): Ongoing research on the causes of variation in calving performance and stillbirths in Swedish dairy population. *Proc. Int. Workshop on Genet. Improvement of Functional Traits in Cattle*, Gembloux, Belgium. *Interbull Bull.* 12:78-82.
- Čítek J., Řehout V., Schröffelová D., Hradecká E. (2008a): Frequency of BLAD and CVM alleles in sires and elite heifers of Czech Holstein cattle. *German Veterinary Journal*, 115, 475-477.
- Čítek J., Řehout V., Hanusová L., Vrabcová P. (2008b): Sporadic incidence of factor XI deficiency in Holstein cattle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2069-2072.

- Čítek J., Řehout V., Procházková H., Hájková J. (2007): Genotyping Glycogen Storage Disease Type II and Type V in Cattle Reared in the Czech Republic. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54, 257-259.
- Čítek J., Řehout V., Hájková J., Pávková J. (2006): Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med – Czech*, 51, 6, 333 - 339.
- Dennis J.A., Healy P.J., Reichmann K.G. (2002): Genotyping Brahman cattle for generalised glycogenosis. *Aust. Vet. J.* 80 (5): 286-291.
- Dennis J.A., Healy P.J. (2001): Genotyping Shorthorn cattle for generalised glycogenosis. *Aust. Vet. J.* 79 (11): 773-775.
- Fries R., Ruvinsky A. (1999): *The Genetics of Cattle*. CAB International. Wallingford. 710 pp.
- Gerardi A. S. (1996): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency: A brief overview of a modern disease and its implications. *Folia Veterinaria*, 40 (3-4), 65-69.
- Gourreau J. M., Vander Massen L., Braque R. (1998a): Le défaut d'adhérence des leucocytes chez les bovins (BLAD). *Le Point Vet.*, 29 (191), 67-74.
- Gourreau J. M., Vander Massen L., Braque R. (1998b): Trois cas cliniques de BLAD. *Le Point Vet.*, 29 (191), 75-76.
- Grupe S., Dietl G., Schwerin M. (1996): Population survey of citrullinemia on German Holsteins. *Livest. Prod. Sci.*, 45 (1), 35-38.
- Grzybowski G. (2003): Zespół zniekształceń kregoslupa – jego konsekwencje w hodowli bydła. *Medycyna Weterynaryjna*, 59 (2): 107 – 111.
- Grzybowski G., Grzybowski T., Wozniak M., Chacinska-Buczek I., Smuda E., Lubieniecki K. (1998): Badania przesiewowe na obecność genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS u bydła w Polsce. *Med. Wet.*, 54 (3), 189-193.
- Harbers A., Segeren L. et de Jong, G. (2000): Genetic Parameters for Stillbirth in the Netherlands. *Proc. of the 2000 Interbull Meeting, Bled, Slovenia, Bull. No 25*, 117-122.
- Harlizius B., Schröber S., Tammen I., Simon D. (1996): Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*, 113, 303-309.
- Healy P. J., Harper P. A. W., Dennis J. A. (1990): Bovine citrullinaemia: a clinical, pathological, biochemical and genetic study. *Austr. Vet. J.*, 67 (6), 255-258.

<http://www.holstein.cz>

<http://www.naab-css.org/education/CVMpressrelease-D.html>: News Release. Complex Vertebral Malformation (CVM).

Johnstone A.C., McSparran K.D., Kenny J.E., Anderson I.L., Macpherson G.R., Jolly R.D. (2004): Myophosphorylase deficiency (glycogen storage disease Type V) in a herd of Charolais cattle in New Zealand: confirmation by PCR-RFLP testing. *New Zealand Veterinary Journal*, 52, 6, 404-8.

Jorgensen J.N., Madsen P. (1997): Genetic parameters for and BLAD effects on beef production traits and diseases frequency. *Acta agriculturae Scandinavica Section A – Animal Science*, 47 (1): 1 – 8.

Jorgensen C. B., Agerholm J. S., Pedersen J., Thomsen P. D. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Hosltein-Friesian Cattle. I. PCR Screening and Allele Frequency Estimation. *Acta Vet. Scand.*, 34 (3), 231-236.

Kehrli M. E., Shuster D. E., Ackermann M. R. (1992): Editorial. Leukocyte Adhesion Deficiency Among Holstein Cattle. *Cornell. Vet.*, 82 (2), 103-109.

Konersmann Y., Wemheuer W., Brenig B. (2003): Origin, distribution and relevance of the CVM defect within the Holstein – Friesian population. *Zuechtungskunde*, 75 (1): 9 – 15.

Konersmann Y. (2002): Herkunft, Verbreitung und Bedeutung des CVM-Gendefektes in der Holstein-Frisian-Population. Masterarbeit, Georg-August Universität Göttingen. 89 pp.

Kuhn M. T., Shanks R. D. (1994): Association of Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase with Production and Reproduction. *J. Dairy Sci.*, 77, 589-597.

Lin D. Y., Huang Y. C., Chen J. C., Yang T. W., Shiao T. F., Chang H. L. (2001): Investigation of citrullinaemia of dairy cattle in Taiwan. *J. Taiwan Livest. Res.*, 34 (4), 279-284.

Lubieniecki K., Grzybowski G., Lukaszewicz M., Lubieniecki J. (1999): Association between the presence of allele BL in the genome of dairy cows and their productivity. *Animal Science Papers and Reports*, 17 (4): 189 – 194.

Mark T., Fikse W.F., Emanuelson U., Philipsson J. (2002): International genetic evaluations of Holstein sires for milk somatic cell and clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 85, (9): 2384 – 2392.



- McDermott J. J., Allen O. B., Martin S. W., Alves D. M. (1992): Patterns of Stillbirth and Dystocia in Ontario cow – calf Herds. *Can. J. Vet. Res.* 56 (1): 47 –55.
- Meyer C. L., Berger P. J., Koehler K. J., Thompson J. R. and Sattler C. G. (2001): Phenotypic Trends in Incidence of Stillbirth for Holsteins in the United States. *J. Dairy Sci.* 84: 515 – 523.
- Meyer C. L., Berger P. J. and Koehler K. J. (2000): Interactions among Factors Affecting Stillbirths in Holstein Cattle in the United States.
- Meylan M., Abegg R., Sager H., Jungi T. W., Martig J. (1997): Fallvorstellung: Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD) in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 139 (6), 277-281.
- Nagahata H., Hatakeyama K., Noda H., Nochi H., Tamoto K. (1994): Two cases of Holstein calves with bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) (Case report). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 101 (2), 53-56.
- Nagahata H., Miura T., Tagaki K., Othake M., Noda H., Yasuda T., Nioka K. (1997): Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 59 (4), 233-238.
- Nagahata H., Nochi H., Tamoto K., Taniyama H., Noda H., Morita M., Kanamaki M., Kociba G. J. (1993): Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Holstein Cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 57, 255-261.
- Natonek M. (2000): Identyfikacja mutacji BLAD u bydła metoda PCR-RFLP. *Biul. Inform.*, 38 (4), 29-33.
- Nielsen U. S., Aamand G. P., Andersen O., Bendixen C., Nielsen V. H., Agerholm J. S. (2003): Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 79, 233-238.
- Nix J. M., Spitzer J.C., Grimes L.W., Burns G.L., Plyler B.B. (1998): A Retrospective Analysis of Factors Contributing to Calf Mortality and Dystocia in Beef Cattle. *Theriogenology*, 49 (8): 1515 – 23.
- Padeeri M., Vijaykumar K., Grupe S., Narayan M. P., Schwerin M., Kumar M. H. (1999): Incidence of hereditary Citrullinaemia and bovine leucocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (BOS TAURUS, BOS INDICUS) and buffalo (BUBALUS BUBALIS) Population. *Arch. Tierz.*, 42 (4), 347-352.

- Pareek C. S., Kaminski S. (1996): Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and its worldwide prevalence. *J. Appl. Genet.*, 37 (3), 299-311.
- Pazdera J. (2001): CVM – letální porucha u skotu. *Náš chov*, 4, 23-24.
- Pasman E., Liu, Z., Reinhardt, F. (2003): An Overview of Results and Current Status of MACE for Calving Traits. Proceedings of the INTERBULL Technical Workshop, Beltsville, MD, USA. March 2 – 3, 2003, Bulletin No. 30: 59 – 70.
- Pedersen G. A. (2000) In Philipsson, J. et Steinbock, L. (2003): Definition of Calving Traits – Results from Swedish Research. Proceedings of the INTERBULL Technical Workshop, Beltsville, MD, USA. March 2 – 3, 2003, Bulletin No. 30: 71 – 74.
- Philipsson J., Steinbock L. (2003): Definition of Calving Traits – Results from Swedish Research. Proceedings of the INTERBULL Technical Workshop, Beltsville, MD, USA. March 2 – 3, 2003, Bulletin No. 30: 71 – 74.
- Philipsson J., Steinbock L., Berglund B. (1997): Considering Stillbirths in the breeding program? Proc. of the 1997 Interbull Meeting, Grub, Germany, Bull. No 18, 25 – 27.
- Philipsson J. (1996): Strategies to reduce problems in calving performance and stillbirths by selection and differential use of bulls. Proc. Int. Workshop on Genet. Improvement of Functional Traits in Cattle, Gembloux, Belgium. INTERBULL Bull. 12:65-71.
- Philipsson J., Foulley J. L., Lederer J., Liboriussen T., Ossinga A. (1979): Sire Evaluation Standards and Breeding Strategies for Limiting Dystocia and Stillbirth. *Livestock Production Sci.* 6:111 – 127.
- Philipsson J. (1976): Studies on Calving Difficulty, Stillbirth and Associated Factors in Swedish Cattle Breeds. III. Genetic Parameters. *Acta Agric. Scand.* 26:211.
- Phocas F., Laloe D. (2003): Evaluation Models and Genetic Parameters fo Calving Difficulty in Beef Cattle. *J. Anim. Sci.* 81 (4): 933 – 938.
- Poli M. A., Dewey R., Semorile L., Lozano M. E., Albarino C. G., Romanowski V., Grau O. (1996): PCR Screening for Carriers of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Argentine Holstein Cattle. *J. Vet. Med. A.*, 43, 163-168.
- Powell R. L., Norman H. D., Cowan C. M. (1996): Relationship of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency with Genetic Merit for Performance Traits. *J. Dairy Sci.*, 79, 895-899.

- Revell S. (2001): Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet. Record*, 24, 659-660.
- Ribeiro L. A., Baron E. E., Martinez M. L., Coutinho L. L. (2000): PCR screening and allele frequency estimation of bovine leucocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, 23 (4), 831-834.
- Robinson J. L., Shanks R. D. (1990): Review. The inherited deficiency of uridine monophosphate synthase in dairy cattle. *J. CAAS*, 1, 1-4.
- Robinson J. L., Popp R. G., Shanks R. D., Oosterhof A., Veerkamp J. H. (1993): Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein-Frisian cattle of North America and Europe. *Livest. Prod. Sci.*, 36, 287-298.
- Rutten V. P. M. G., Hoek A., Müller K. E. (1996): Identification of monoclonal antibodies with specificity to  $\alpha$ - or  $\beta$ - chains of  $\beta 2$  – integrins using peripheral blood leucocytes of normal and Bovine Leucocyte Adhesion Deficient (BLAD) cattle. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 52 (4), 341-345.
- Schwenger B., Schröder S., Simon D. (1993): DUMPS Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. *Genomics*, 16, 241-244.
- Schwenger B., Tamen I., Aurich C. (1994): Detection of the homogenous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 100, 511-514.
- Shanks R. D. (1990): Reproductive consequences of deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 51 (5), 800-802.
- Shanks R. D., Bragg D. ST. A., Barton E. P. (1989): Uridine Monophosphate synthase of Jersey Bulls. *J. Dairy Sci.*, 72, 722-725.
- Shanks R. D., Bragg D. ST. A., Robinson J. L. (1987): Deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle: inheritance and body measurements. *J. Anim. Sci.*, 64, 695-700.
- Shanks R. D., Greiner M. M. (1992): Relationship Between Genetic Merit of Holstein Bulls and Deficiency of Uridine – 5' - Monophosphate Synthase. *J. Dairy Sci.*, 75 (7), 2023-2029.
- Shanks R. D., Robinson J. L. (1989): Embryonic Mortality Attributed to Inherited Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase. *J. Dairy Sci.*, 72, 3035-3039.

- Shanks R. D., Robinson J. L. (1990): Editorial. Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase Among Holstein Cattle. *Cornell. Vet.*, 80 (2), 119-122.
- Shuster D.E., Kehrlı M.E., Ackermann M.R., Gilbert R.O. (1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes leucocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *PNAS*, 80 (19): 9225 – 9229.
- Simon A., Le Goic D., Breyton I., Douart A., Lecoanet J. (1998): Syndrome de Déficiene d'Adhésıon des Leucocytes Bovins (DALB): a propos d'une observation clinique. *Le Point Vet.*, 29 (192), 83-86.
- Snoj T. (2002): Kompleksna vertebralne malformacija pri teletih črno-bele pasme. *Vet. Nov.*, 28, 197-199.
- Soethout E.C., Verkaar E.L.C., Jansen G.H., Mueller K.E., Lenstra J.A. (2002): A Direct StyI Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Test for the Myophosphorylase Mutation in Cattle. *J Vet Med A*, 49, 289-290.
- Tainturier D., Grobet L., Brouwers B., Bruyas J.-F., Fieni F., Battut I., Lecoanet J., Douart A., Breyton I., Duclos P. (1995): Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD): a propos de trois observations cliniques. *Revue Méd. Vét.*, 146 (3), 189-193.
- Thompson, J.R., Freeman, A.E., Berger, P.J. (1981): Age of dam and maternal effects for dystocia in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 64 (7): 1603 – 1609.
- Tsujino S., Shanske S., Valberg S.J., Cardinet G.H. 3rd, Smith B.P., Di Mauro S. (1996): Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromuscul Disord.*, 6, 1, 19-26.
- Viana J. L., Fernandez A., Iglesias A., Santamarina G. (1998): Diagnóstico y control de las principales enfermedades genéticas (citrulinemia, DUMPS y BLAD) descritas en ganado Holstein-Frisón. *Med. Vet.*, 15 (10), 538-544.
- Van Dieten S. W. J. (1963): Mortaliteit van Kalveren bij de Partus á Terme van M.R.I.J. Runderen. Diss. Faculteit des Diergeneeskunde, Rijksuniversitet, Utrecht.
- Weigel K.A. (2001): Limiting the consequences of inbreeding in dairy cattle breeding programs. In: 52nd Annual Meeting of the EAAP, Budapest, Hungary, 74.

Weller J. I., Gianola D. (1989): Models fo Genetic Analysis of Dystocia and Calf Mortality. J. Dairy Sci. 72 (10): 2633 – 43.

Weller J. I., Misztal I., Gianola G. (1988): Genetic Analysis of D ystocia and Calf Mortality in Israeli-Holsteins by Threshold and Linear Models. J. Dairy Sci. 71 (9): 2491 – 2501.

[www.angis.org.au](http://www.angis.org.au)

Zabek T., Rys A. (1998): Gene defect in farm animals. Biul. Inform. Inst. Zootech., 36 (4), 5-13.

|                |  |
|----------------|--|
| <b>Název:</b>  | <b>Organizační postupy pro odhalování skrytých přenašečů geneticky podmíněných poruch zdraví</b>   |
| Autoři:        | doc. Ing. Jindřich Čítek, CSc.<br>prof. Ing. Václav Řehout, CSc.<br>Ing. Eva Hradecká, Ph.D.<br>Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.<br>Ing. Libor Večerek |
| Oponenti:      | doc. Ing. mgr. Ivan Majzlík, CSc.<br>ČZU Praha<br>Prof. Dr. hab. Andrzej Filistowicz<br>University of Life Sciences, Wrocław, Poland             |
| Vydání:        | 1.   |
| Vydal:         | Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích<br>Zemědělská fakulta<br>Studentská 13, 370 05 České Budějovice                                      |
| Počet výtisků: | 50   |
| Počet stran:   | 33   |
| AA:            | 2,2  |
| Tisk:          | Ediční středisko ZF JU   |
| ISBN:          | 978-80-7394-152-9  |
| Delikace:      | výstup výzkumného záměru MŠMT MSM 6007665806   |