

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

—  
FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ  
Klinická laboratoř pro velká zvířata



# LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA U POTRAVINOVÝCH ZVÍŘAT

—  
*Praktická cvičení*



Mgr. Karolína Píšťková  
Lenka Danielová  
doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM



BRNO 2016

**FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ**

Klinická laboratoř pro velká zvířata



**Laboratorní diagnostika  
u potravinových zvířat  
praktická cvičení**

Mgr. Karolína Píšťková

Lenka Danielová

doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM

## **Slovo úvodem**

Tato skripta jsou určena pro studenty FVL a FVHE navštěvující předmět Laboratorní diagnostika u potravinových zvířat. Studijní materiály byly vytvořeny za účelem zkvalitnění výukového procesu v rámci laboratorní diagnostiky a propojení souvislostí mezi laboratorní a veterinární částí diagnostického procesu. Skripta obsahují celkový přehled standardních laboratorních vyšetření prováděných u potravinových zvířat zahrnující informace od odběru vzorků přes používané metody až po vyhodnocení výsledků a stanovení správné diagnózy. Skripta jsou koncipována do jednotlivých kapitol dle osnovy předmětu a jsou tedy vhodnými podklady ke studiu v průběhu výuky předmětu a k získání zápočtu i zkoušky.

# Obsah

1	Úvod.....	9
2	Hematologické vyšetření.....	11
2.1	Preanalytická fáze.....	11
2.1.1	Odběr vzorku.....	11
2.2	Analytická fáze.....	12
2.2.1	Impedanční metoda.....	13
2.2.2	Kolorimetrická metoda.....	13
2.2.3	Měření a výpočet jednotlivých hematologických parametrů.....	14
2.2.4	Diferenciální rozpočet leukocytů.....	17
2.3	Postanalytická fáze.....	18
2.3.1	Onemocnění červené krevní řady.....	18
2.3.2	Onemocnění bílé krevní řady.....	21
3	Vyšetření kolostrální imunity.....	25
3.1	Preanalytická fáze.....	25
3.1.1	Odběr vzorku.....	26
3.2	Analytická fáze.....	28
3.2.1	Hodnocení kvality kolostra.....	28
3.2.2	Kontrola kolostrální výživy telat.....	30
3.3	Postanalytická fáze.....	39
3.3.1	Poruchy metabolismu.....	40
3.3.2	Výskyt infekčních onemocnění.....	41
4	Vyšetření bachorové tekutiny.....	42

4.1	Preanalytická fáze.....	42
4.1.1	Odběr vzorku .....	42
4.2	Analytická fáze .....	43
4.2.1	Fyzikální parametry bachorové tekutiny .....	43
4.2.2	Chemické parametry bachorové tekutiny .....	44
4.3	Postanalytická fáze .....	53
4.3.1	Jednoduchá bachorová indigestce ( <i>Indigestio simplex</i> ).....	53
4.3.2	Akutní acidóza bachorového obsahu ( <i>Acidosis ingestorum ruminis acuta</i> ).....	54
4.3.3	Subakutní acidóza bachorového obsahu (SARA) .....	55
4.3.4	Alkalóza bachorového obsahu ( <i>Alcalosis ingestorum ruminis</i> ) .....	56
4.3.5	Hniloba bachorového obsahu ( <i>Putrefactio ingestorum ruminis</i> ).....	57
5	Biochemické vyšetření .....	60
5.1	Preanalytická fáze.....	60
5.1.1	Odběr vzorku .....	60
5.2	Analytická fáze .....	62
5.2.1	Fotometrická stanovení biochemických parametrů.....	62
5.2.2	Chemiluminiscenční imunometrická analýza hormonů .....	65
5.2.3	Vyšetření acidobazické rovnováhy.....	67
5.3	Postanalytická fáze .....	68
5.3.1	Energetický profil.....	69
5.3.2	Dusíkový a bílkovinný profil.....	70
5.3.3	Enzymový a hepatální profil .....	71
5.3.4	Vitamínový profil .....	72
5.3.5	Acidobazická rovnováha .....	73

5.3.6	Močový profil.....	75
6	Vyšetření minerálních prvků.....	78
6.1	Preanalytická fáze.....	78
6.1.1	Odběr vzorku.....	78
6.2	Analytická fáze.....	80
6.2.1	Příprava vzorku.....	80
6.2.2	Atomová absorpční spektrometrie (AAS).....	83
6.3	Postanalytická fáze.....	88
6.3.1	Makromineralní profil.....	88
6.3.2	Mikroelementový profil.....	90
7	Literatura.....	94

## Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
Ab	protilátka
ABR	acidobazická rovnováha
Ag	antigen
ALB	albumin
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotranferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BE	přebytek bází (base excess)
BHB	$\beta$ -hydroxybutyrát
BT	bachorová tekutina
BVD	bovinní virová diarrhea
CB	celková bílkovina
CK	kreatinkináza
CNS	centrální nervová soustava
CREAT	kreatinin
EDTA	etylen-diamino-tetraoctová kyselina
ET AAS	elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
F AAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
GIT	gastrointestinální trakt
GMT	$\gamma$ -glutamyl transferáza

GLU	glukóza
HCT	hematokrit
HG AAS	hydridová atomová absorpční spektrometrie
HGB	hemoglobin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CHOL	cholesterol
IBR	infekční bovinní rinotracheitída
IgG	imunoglobuliny
ITP	izotachoforéza
KD	krmná dávka
LD	laktátdehydrogenáza
MCH	střední obsah hemoglobinu v buňce
MCHC	koncentrace hemoglobinu v buňce
MCV	střední objem erytrocytů
MPW	střední objem trombocytů
NEMK	nenasycené mastné kyseliny
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok (Phosphate Buffered Saline)
PCT	hematokrit destiček - trombokrit
PDW	distribuční šířka trombocytů
PLT	krvní destičky
RBC	červené krvinky
RDW	distribuční šířka erytrocytů
RID	radiální imunodifúze



ROS	reaktivní formy kyslíku
SARA	subklinická acidóza bacheru
SB	standardní hydrogenuhličitan/bikarbonáty
SOD	superoxid dismutáza
TAG	triacylglyceroly
TAS	celková antioxidační kapacita
TBIL	celkový bilirubin
TMK	těkavé mastné kyseliny
TT3	trijodtyronin
TT4	tyroxin
WBC	bílé krvinky

# 1 Úvod

**Diagnostika** je proces zahrnující různé vyšetřovací postupy, jehož cílem je stanovení diagnózy. Diagnózou se rozumí rozpoznání nemoci a její pojmenování. Důležitou částí diagnostických postupů je laboratorní vyšetření.

**Laboratorní diagnostika** je prováděna mimo živý organismus. Odebraný biologický materiál je spolu s vyplněnou žádankou (Obr 1) odeslán do klinické laboratoře, kde se laboratorní vyšetření realizuje. Biologickým materiálem je např. krev, moč, kolostrum, mléko, výkaly, bachorová tekutina, mozkomíšni mok, vzorky tkání. Předmětem laboratorního vyšetření je stanovení hodnot veličin biochemických, hematologických, imunologických a dalších. Vyšetřování odebraných tělních tekutin nebo vzorků tkání může být prováděno ve zkumavce, v reakční jamce, v misce na živné půdě či na podložním skle.

Laboratorní diagnostika se člení na **základní** laboratorní vyšetření a **speciální** laboratorní vyšetření. Mezi základní vyšetření patří hematologické vyšetření a vyšetření základních biochemických parametrů v krvi, vyšetření moči, vyšetření bachorové tekutiny u přežvýkavců a další. Speciální laboratorní vyšetření zahrnuje např. stanovení různých markerů, hormonů či stanovení parametrů pomocí molekulárně biologických metod. Dle rychlosti stanovení daných parametrů se laboratorní vyšetření člení na **rutinní** (základní) a **statimová** (přednostní). Takzvané **screeningové testy** se provádějí preventivně ve velkých skupinách zvířat. Jsou prováděny z důvodu podezření výskytu nějakého onemocnění nebo prevence - kontroly zdravotního stavu stáda.

Získané výsledky vyšetření poskytují informace pro diagnostiku, terapii, prevenci nebo posouzení zdravotního stavu jedinců a stád. Díky laboratornímu vyšetření lze onemocnění diagnostikovat již v době bez viditelných příznaků a lze mu tak předejít nebo poškození organismu snadněji léčit. Díky změnám některých stanovených parametrů v krvi lze usuzovat, zda je léčba úspěšná, či je nutné ji změnit.

Laboratorní vyšetření tedy slouží k objektivizaci výsledků s cílem určit diagnózu a kontrolovat účinnost terapie, ke kontrole výživy zvířat (preventivní metabolické testy) a v neposlední řadě k stanovení referenčních hodnot.

Laboratorní vyšetření musí mít požadovanou kvalitu neboli jakost. **Kvalitu laboratorního vyšetření** charakterizují zejména **přesnost a správnost** stanovených parametrů a jejich **reprodukovatelnost a opakovatelnost** v rámci série vzorků.

Laboratorní vyšetření se dělí na tři základní fáze:

- **preanalytická** - odběr a uchování vzorku a jeho transport do laboratoře
- **analytická** - stanovení parametrů pomocí daných laboratorních metod
- **postanalytická** - interpretace výsledků měření

KREV		KREV	
1	Celková bílkovina	85	• Celkový T3
2	• Albumin	86	• Celkový T4
10	Celkový bilirubin	89	• Kortizol
11	Kreatinin	41	• Inzulin
12	Glukosa		
14	Kyselina močová		
15	Močovina		
25	ALP	122	pH
26	ALT	115	Ketolátky (semikvant.)
27	AMS	101	Specifická hodnota
28	AST	123	Screening papír
29	CK	129	Sediment
31	GMT	102	Močovina
34	LD	103	Kreatinin
71	Cholesterol	113	GMT
72	Triglyceridy	105	Na
51	Na	106	K
52	K	107	Ca
53	Ca	108	Mg
54	P	109	P
55	Cl	110	Cl
56	Zn		
57	Cu		
58	Mg	141	□ pH
59	Fe	143	□ Celková acidita
60	Se	144	□ Počet nálevníků
18	Mn	145	□ Laktát
295	• Imunoglobuliny (ZnS)	146	x TMK
9	• Žlučové kyseliny	165	□ Amoniak
78	• NEMK	166	Chloridy
81	Vitamin A		
83	Vitamin E		
84	Beta - karoten		
77	BHB		
48	SOD		
49	# GPX		
74	TAS		

MOČ		BT	
122	pH	141	□ pH
115	Ketolátky (semikvant.)	143	□ Celková acidita
101	Specifická hodnota	144	□ Počet nálevníků
123	Screening papír	145	□ Laktát
129	Sediment	146	x TMK
102	Močovina	165	□ Amoniak
103	Kreatinin	166	Chloridy
113	GMT		
105	Na		
106	K		
107	Ca		
108	Mg		
109	P		
110	Cl		

HEMATOLOGIE	
	Hemoglobin
	Hematokrit
	Erytrocyty
	Leukocyty
300	Trombocyty
301	DIFERENCIAL

Metoda	Výsledek	Jednotky	Referenční meze	Hodnocení
Celk.bílkovina	69.90	g/l		
Albumin	33.30	g/l		
Globulin vypočet	36.60			
A/G	0.91			
Glukosa	1.68	mmol/l		
Mocovina	4.54	mmol/l		
Celk.bilirubin	5.40	umol/l		
AST	1.19	ukat/l		
ALT	0.44	ukat/l		
LDH	16.93	ukat/l		
Triglyceridy	0.36	mmol/l		
Cholesterol	2.3	mmol/l		
Vapnik	2.26	mmol/l		
Fosfor	2.20	mmol/l		
Zinek	14.72	umol/l		
Med	9.14	umol/l		
Horcik	0.98	mmol/l		
Selen krev	139.10	ug/l		
Vitamin A	0.99	umol/l		
Vitamin E	10.06	umol/l		
b-karoten	8.23	umol/l		
NEMK	0.37	mmol/l		
SOD	367.90	U/mL		
GPX	1245.60	ukat/L		
b-hydroxybutyrát	0.3	mmol/l		
celk.antiox.akt.	0.83	mmol/l		
pH-bt	6.14			
Celk.acidit-bt	35.5	arb.jed.		
Nalevníci-bt	208	tisíc/ml		
k.mlečna-bt	<1	mmol/l		
amoniak-bt	11.81	mmol/l		
Krevní obraz	0			
Diferencial	0			
celk.TMK-bach	84	mmol/l		
k.octova-BT	62.9	mol%		
k.propionova-BT	19.8	mol%		
k.n-maselna-BT	12.3	mol%		
k.n-valerova-BT	5.1	mol%		

**Obr 1: Žádanka o vyšetření (vlevo) a protokol s výsledky vyšetření v KLVZ (vpravo)**

## 2 Hematologické vyšetření

Hematologické vyšetření se provádí při diagnostice onemocnění krve a krvetvorných orgánů, hypoxických stavů, dehydratací, infekcí, zánětů, otrav, nádorových onemocnění, traumat, orgánových insuficiencí, poruch výživy a metabolismu, imunopatologických stavů, stresu, šokových stavů, únavě či slabosti a v neposlední řadě v rámci preventivního a předoperačního vyšetření. Hematologické vyšetření zahrnuje vyšetření červeného krevního obrazu, krevních destiček a bílé krevní řady. Mezi stanovované parametry červené krevní řady patří stanovení počtu erytrocytů, hematokritu, hemoglobinu, středního objemu erytrocytů (MCV), středního množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). V rámci vyšetření bílé krevní složky krve je stanovován počet leukocytů, poměrné zastoupení jednotlivých bílých krvinek (leukogram) a dále morfologické abnormality leukocytů.

### 2.1 Preanalytická fáze

#### 2.1.1 Odběr vzorku

Na hematologické vyšetření se vzorek odebírá do speciální hematologické zkumavky



s antikoagulantem (Obr 2). Jako protisrážlivé činidlo se používá EDTA (etylen-diamino-tetraoctová kyselina) a zabraňuje tedy srážení krve. Komerčně vyráběná zkumavka je určena na daný objem krve, který je znázorněn ryskou.

**Obr 2: Zkumavky s EDTA pro odběr krve na hematologické vyšetření**

Přehled odběrových míst u daných zvířat je uveden v Tab 1. Při odběru musí být dodržovány tyto zásady:

- správný objem vzorku
  - nedostatečné množství krve → vzorek je příliš naředěný antikoagulantem → výsledky jsou ovlivněny (↓hematokrit, ↑MCHC)

- větší množství krve → vzorek se může srazit (málo antikoagulantu na větší množství krve) → vzorek není možné správně analyzovat a získat objektivní výsledek
- promíchání krve ihned po odběru
  - pokud nedojde k promíchání antikoagulantu s krví, vzorek se srazí → vzorek nelze použít k analýze
- uchování vzorku při pokojové teplotě (18 - 25 °C)

**Tab 1: Místa odběru krve u jednotlivých druhů zvířat**

Druh zvířete	Místo odběru
Skot	v. jugularis; v. coccygea
Ovce	v. jugularis
Koza	v. jugularis
Prase	v. cava cranialis
Kůň	v. jugularis

## 2.2 Analytická fáze

Výsledkem hematologického - morfologického vyšetření je **krevní obraz a diferenciální rozpočet bílé krevní řady**. Ke stanovení hematologických parametrů je využíván automatický hematologický analyzátor a mikroskopické vyhodnocení krevního nátěru.

Před samotným stanovením je důležité vzorek šetrně promíchat (Obr 3) a stanovení provést do dvou hodin od odběru.



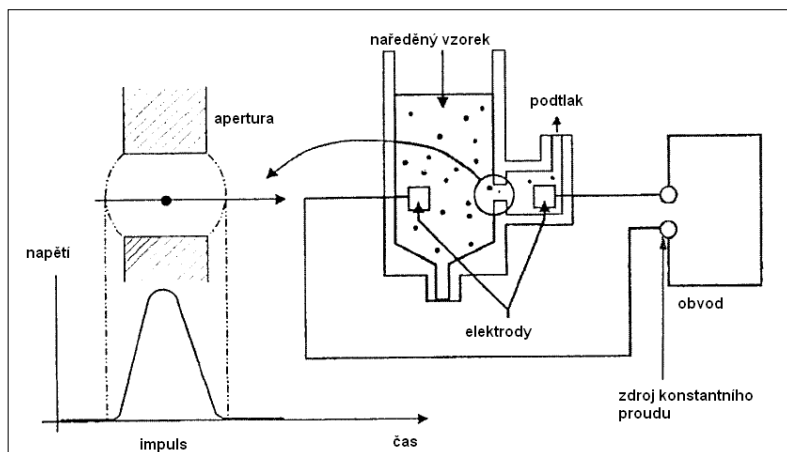
**Obr 3: Promíchání vzorků před stanovením**

Stanovení počtu krevních elementů, hemoglobinu, hematokritu a parametrů týkajících se erytrocytů je prováděno na automatickém hematologickém analyzátoru BC-2800 Vet (Obr 5). Měření je založeno na dvou nezávislých metodách:

- impedanční metoda - stanovení WBC, RBC, PLT
- kolorimetrická metoda - stanovení HGB

### 2.2.1 Impedanční metoda

Principem impedanční metody je měření změn elektrického odporu způsobených naředěnou suspenzí krevních částic, která je nasávána do měřicí apertury. Z obou stran apertury jsou umístěny elektrody, které vytvářejí elektrický obvod. Mezi elektrodami je udržováno konstantní napětí. V měřicí části je ředící izotonický roztok, tzv. diluent a protéká zde konstantní stejnosměrný proud. Při průchodu krevní částice aperturou dojde k poklesu elektrického proudu protékajícího mezi elektrodami a k nárůstu elektrického odporu mezi



elektrodami, což má za následek vznik napěťového impulsu (Obr 4).

#### Obr 4: Schéma principu impedanční metody

(zdroj: BC – 2800 Vet: Operation Manual. Shenzhen Mindray Bio-Medical electronics Co., Ltd., Čína, 2005-2007)

Počet impulsů odpovídá počtu buněk prošlých aperturou za určitou časovou jednotku. Amplituda každého pulsu je přímo úměrná objemu každé částice.

### 2.2.2 Kolorimetrická metoda

Kolorimetrická metoda je založena na měření barevného produktu při dané vlnové délce. Na jedné straně měřicí nádobky je umístěn zdroj monochromatického záření a na straně protější fotosenzor. Vzniklý hemoglobinový komplex je měřen při vlnové délce 525 nm.



Signál je poté amplifikován a měřené napětí je srovnáváno se stanovenou hodnotou blanku. Koncentrace hemoglobinu je vyjadřována v jednotkách g/l.

#### Obr 5: Automatický hematologický analyzátor BC-2800 Vet

## 2.2.3 Měření a výpočet jednotlivých hematologických parametrů

### 2.2.3.1 Bílá krevní řada

- Bílé krvinky - leukocyty (WBC)

Jsou počítány přímo při průchodu aperturou. Počet/koncentrace bílých krvinek je vyjadřována v jednotkách  $10^9/l$ .

$$WBC = n \times 10^9/l$$

- Diferenciální rozpočet bílé krevní řady

Analyzátor je schopen vyhodnotit třípopulační diferenciál - lymfocyty, monocyty a granulocyty (Obr 6). Tyto parametry jsou vyjadřovány v jednotkách  $10^9/l$  nebo v %.

- Histogram bílých krvinek

Kromě již zmíněných parametrů vytváří analyzátor na základě měření i WBC histogram, kde osa x představuje objem buňky (fl) a osa y odpovídá počtu buněk.

### 2.2.3.2 Červená krevní řada

- Červené krvinky - erytrocyty (RBC)

Jsou počítány přímo při průchodu aperturou. Počet červených krvinek jsou vyjadřovány v jednotkách  $10^{12}/l$ .

$$RBC = n \times 10^{12}/l$$

- Střední objem erytrocytů (MCV)

Střední objem erytrocytů je analyzátořem vyhodnocován na základě histogramu červených krvinek a slouží k diagnostice anémií dle změn ve velikosti erytrocytů. Vyjadřuje se v jednotkách fl.

- Hematokrit (HCT)

Hodnota hematokritu je počítána dle níže uvedené rovnice a je vyjadřována v %.

$$HCT = RBC \times MCV / 10$$

- Střední obsah hemoglobinu v buňce (MCH)

MCH slouží k diagnostice anémií dle změn v barvitelnosti erytrocytů. Je vyjadřován v jednotkách pg a vypočítáván dle rovnice:

$$MCH = HGB/RBC$$

- Koncentrace hemoglobinu v buňce (MCHC)

Koncentrace hemoglobinu v buňce je počítána dle následující rovnice a vyjadřuje se v jednotkách g/l. Slouží k diagnostice anémií dle změn v barvitelnosti erytrocytů.

$$\text{MCHC} = \text{HGB} / \text{HCT} \times 100$$

- Distribuční šířka erytrocytů (RDW)

Tento parametr vychází z histogramu erytrocytů podle MCV a slouží k hodnocení nestejně velikosti erytrocytů.

- Histogram červených krvinek

Kromě již zmíněných parametrů vytváří analyzátor na základě měření i RBC histogram, kde osa x představuje objem buňky (fl) a osa y odpovídá počtu buněk.

### 2.2.3.3 Krevní destičky

- Krevní destičky - trombocyty (PLT)

Jsou počítány přímo při průchodu aperturou. PLT jsou vyjadřovány v jednotkách  $10^9/l$ .

$$\text{PLT} = n \times 10^9/l$$

- Střední objem trombocytů (MPV)

Střední objem trombocytů je analyzátořem vyhodnocován na základě histogramu krevních destiček a vyjadřuje se v jednotkách fl.

- Distribuční šířka trombocytů (PDW)

Tento parametr vychází z histogramu trombocytů podle MCV a slouží k hodnocení nestejně velikosti trombocytů.

- Hematokrit destiček - trombokrit (PCT)

Hodnota PCT je počítána dle následující rovnice a vyjadřuje se v %.

$$\text{PCT} = \text{PLT} \times \text{MPV} / 10000$$

- Histogram krevních destiček

Kromě již zmíněných parametrů vytváří analyzátor na základě měření i PLT histogram, kde osa x představuje objem buňky (fl) a osa y odpovídá počtu buněk.

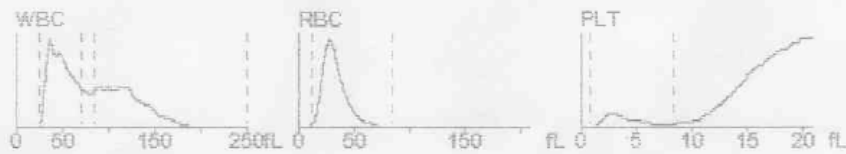
Referenční hodnoty výše uvedených hematologických parametrů jsou uvedeny v Tab 2.



VFU Brno, KLVZ-1700

Owner's name: tk Time: 05-09-2016 13:17  
 Animal name: Animal type: Cow  
 ID: 5 Gender: Age: Mode: Whole Blood

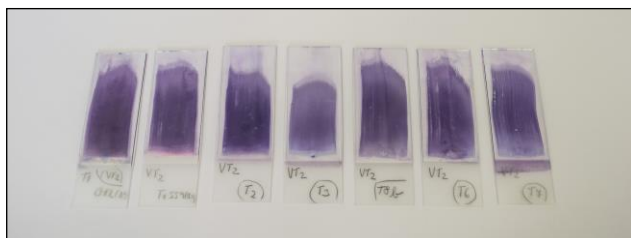
Parameter	Result	Ref. Range
WBC	9.3 x 10 <sup>9</sup> /L	5.0 - 16.0
Lymph#	4.2 x 10 <sup>9</sup> /L	1.5 - 9.0
Mon#	0.8 x 10 <sup>9</sup> /L	0.3 - 1.6
Gran#	4.3 x 10 <sup>9</sup> /L	2.3 - 9.1
Lymph%	44.9 %	20.0 - 60.3
Mon%	9.1 %	4.0 - 12.1
Gran%	46.0 %	30.0 - 65.0
RBC	9.31 x 10 <sup>12</sup> /L	5.00 - 10.10
HGB	99 g/L	90 - 139
HCT	34.5 %	28.0 - 46.0
MCV	L 37.1 fL	38.0 - 53.0
MCH	L 10.6 pg	13.0 - 19.0
MCHC	L 286 g/L	300 - 370
RDW	H 21.4 %	14.0 - 19.0
PLT	301 x 10 <sup>9</sup> /L	120 - 600
MPV	L 4.8 fL	5.0 - 9.0
PDW	14.8	
PCT	0.144 %	



**Obr 6: Protokol hematologického vyšetření**

## 2.2.4 Diferenciální rozpočet leukocytů

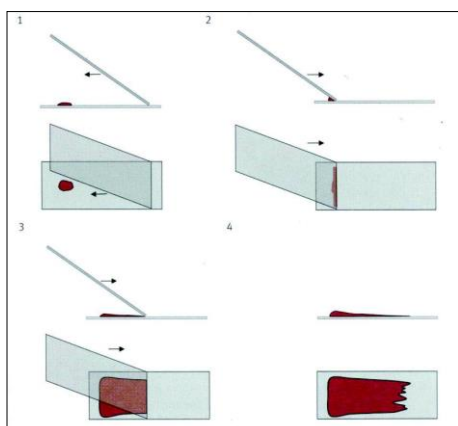
Krevní nátěr je důležitou součástí hematologického vyšetření, jehož vyhodnocení nám poskytuje diferenciální krevní obraz. Diferenciální rozpočet leukocytů slouží k diagnostice a prevenci různých onemocnění. K rozpoznání jednotlivých druhů krvinek je třeba zhotovit technicky kvalitní nátěr (Obr 7).



**Obr 7: Obarvené krevní nátěry vhodné k vyhodnocení**

### 2.2.4.1 Příprava a vyhodnocení krevního nátěru

Vzorek krve se kápne na kraj (za zábrus) čistého a odmaštěného podložního sklíčka. Kapka krve se rozetře pomocí sklíčka roztěrového po celé délce (viz Obr 8). Vzniklá jednobuněčná vrstva se nechá zaschnout a poté se obarví. Barvení nátěrů je prováděno pomocí komerčně dodávané rychlobarvicí soupravy Hemacolor od firmy Merck (Obr 9). Základem barvení je



fixace metanolem, obarvení azurem B (oxidační produkt methylenové modři) a eozinem G. Azurové ionty jsou kladně nabitě a barví acidofilní buněčné komponenty odstíny modré a purpurové barvy, naproti tomu negativně nabitě eosinové ionty barví bazické složky buněk oranžovou až růžovou barvou. Neutrofilní granulace se barví azurovými složkami barvicího roztoku.

**Obr 8: Příprava krevního nátěru**

(zdroj:om/images/page/News/laboklin\_aktuell/lab\_akt\_1104\_3.png)

**\*\* 5x1s fixace alkoholem → 3x1s Eosin G  
→ 6x1s Azur B →  
→ 2x10s destilovaná voda \*\***



**Obr 9: Rychlobarvicí souprava Hemacolor**

Vyhodnocení diferenciálního krevního obrazu se provádí mikroskopicky za použití imerzního



oleje při zvětšení 100x (Obr 10). Diferenciální rozpočet bílých krvinek představuje zastoupení jednotlivých druhů leukocytů v jejich celkovém počtu. Diferenciální krevní obraz se vyhodnocuje do minimálního počtu 50 buněk a hodnoty jednotlivých leukocytů se vyjadřují v % (Tab 3).

**Obr 10: Vyhodnocení diferenciálního krevního obrazu**

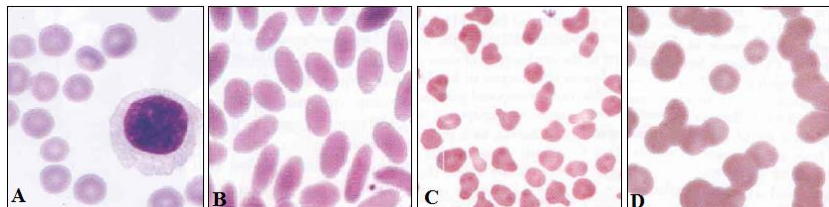
## 2.3 Postanalytická fáze

Hematologické vyšetření je využíváno k diagnostice a terapii konkrétních klinických onemocnění jednotlivých zvířat. Hematologický profil zahrnuje vyšetření bílé krevní řady a vyšetření červené krevní řady. Na základě vyhodnocení stanovených parametrů jsou diagnostikovány poruchy související s výskytem jednotlivých typů krevních buněk.

### 2.3.1 Onemocnění červené krevní řady

#### 2.3.1.1 Erytrocytóza

Erytrocytóza se vyznačuje **zvýšením počtu erytrocytů** (Obr 16) v krevním řečišti. Za fyziologických podmínek může být příčinou zvýšení počtu erytrocytů adaptace zvířat v horských podmínkách. Organismus potřebuje vyšší zásobu kyslíkem a dochází i ke zvýšení erytrocytů, které jsou zdrojem potřebného kyslíku. Dalšími důvody vzniku erytrocytózy jsou různé hypoxické stavy, kdy organismus potřebuje kompenzovat nedostatek kyslíku - např. chronické pneumonie, asfyxie při porodech. Dále k erytrocytóze dochází při šoku, stresu, aplikaci léčiv - diuretik, při horečce, popáleninách a dehydrataci. V případě dehydratace se jedná o relativní zvýšení.



**Obr 11: Morfologie erytrocytů:**

A - erytrocyty u krávy a lymfocyt (vpravo); B - erytrocyty u lamy;  
C - erytrocyty u kozy; D - erytrocyty u koně  
(zdroj: Harvey W. J., 2012)

### 2.3.1.2 Erytropénie

**Snížení počtu erytrocytů** v krevním řečišti neboli erytropénie je diagnostikována při anémiích, urémiích a hyperhydrataci.

### 2.3.1.3 Anémie

K anémii dochází při celkovém **snížení erytrocytů, hematokritu a hemoglobinu** v krevním řečišti.

Anémie se dělí na 2 základní skupiny:

- anémie primární - postižení kostní dřeně
- anémie sekundární - kromě postižení kostní dřeně

Při sekundárních anémiích se většinou uplatňují infekční agens. Erytrocyty napadají krevní parazité, kteří je lyzují - např. babezióza. Dále se uplatňují i bakterie jako leptospiróza, mycoplasma, clostridie a další.

### *Hypoplastická anémie*

Jeden z důvodů vzniku hypoplastické anémie je **hypofunkce kostní dřeně**. Příčinou může být např. působení toxinů, nedostatek železa, mědi, kobaltu, vitamínu B12, aminokyselin a dalších významných látek podporující vznik krve. Druhým důvodem je snížená erytropoéza, kdy dochází k nízké tvorbě nových erytrocytů.

### *Hemolytická anémie*

Při hemolytické anémii dochází k poškození erytrocytů, z kterých se začne uvolňovat hemoglobin do plazmy - tomuto stavu se říká **hemoglobinémie**. Nebo dochází k uvolnění hemoglobinu do moče - v tomto případě se jedná o **hemoglobinurii**.

Hemoglobinémie se po klinické stránce charakterizuje ikterem a anémií (bledostí sliznic zejména spojivky).

Existuje několik typů hemoglobinurie. **Paroxysmální hemoglobinurie** je v podstatě intoxikace vodou neboli přepití vodou. Při delším žíznění zvířete je najednou zajištěn příjem neomezeného množství vody a zvíře se přepije. Erytrocyty to nevydrží a popraskají a dochází k osmotické hemolýze. Paroxysmální hemoglobinurie se vyskytuje většinou u zvířat na pastvě. **Enzootická hemoglobinurie**, ke které dochází v dnešní době velmi málo, je způsobena otravou hasivkou orličí. A v neposlední řadě se hemoglobinurie projevuje při chronické otravě mědí.

K tzv. **hypofosfatemické hemoglobinurii** dochází při dlouhodobém deficitu fosforu, metabolické acidóze a zvýšeném příjmu soponinů (chrást).

#### *Posthemoragická anémie*

K posthemoragické anémii dochází z důvodu akutní nebo chronické ztráty krve vzniklé poraněním, chirurgickým zákrokem nebo při krvácení po porodu.

#### *2.3.1.4 Methemoglobinemie*

Methemoglobin je patologická forma hemoglobinu, která vzniká přeměnou  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ . Jedná se o **reverzibilní změnu se ztrátou transportní funkce kyslíku a oxidu uhličitého**. Dochází tedy ke tkáňovému dušení, které se klinicky projevuje cyanózou sliznic, únavou a dyspnoí. Methemoglobinemii způsobuje otrava dusitany, dusičnany a chlorovými preparáty.

#### *2.3.1.5 Trombocytopenie*

Trombocytopenie je charakterizována **snížením počtu krevních destiček** v krevním řečišti. Ke vzniku tohoto onemocnění dochází buď sníženou tvorbou trombocytů v důsledku aplikace léčiv, nebo např. při leukémii. U prasat dochází k výraznému snížení při intoxikaci mykotoxiny především aflatoxinem B1. Dalšími důvody vzniku jsou četné destrukce při imunitních onemocněních nebo aplikace léčiv - např. heparinu.

#### *2.3.1.6 Trombocytóza*

**Zvýšení počtu krevních destiček** v krevním řečišti je označováno jako trombocytóza. Chronické záněty, deficit železa, stres, akutní krvácení nebo aplikace léčiv - kortikoidů, adrenalinu vedou ke vzniku trombocytózy.

#### *2.3.1.7 Hematokrit*

Hematokrit představuje procentuální zastoupení erytrocytů v celkovém množství krve. K výraznému **snížení hematokritu** dochází **v průběhu anemií při selhávání ledvin**, kdy je nedostatečná tvorba erythropoetinu. Erythropoetin je hormon zvyšující tvorbu erytrocytů v kostní dřeni. U vysokoprodukčních dojnic dochází k výraznému **zvýšení hematokritu při dojení**, jehož hladina se během dne opět upraví.

#### *2.3.1.8 Změny parametru MCV*

MCV je průměrná velikost erytrocytu. Na základě velikosti a sníženém počtu erytrocytů se rozlišují tři typy anemií. Pokud je velikost erytrocytu v normě jedná se o **normocytární anémii**.

V případě **mikrocytární anémie** je velikost erytrocytů v krevním řečišti malá. Důvodem může být chronické onemocnění, hemolytická anémie nebo sideropenická anémie. K sideropenické anémii dochází především u selat a je způsobena nedostatkem železa.

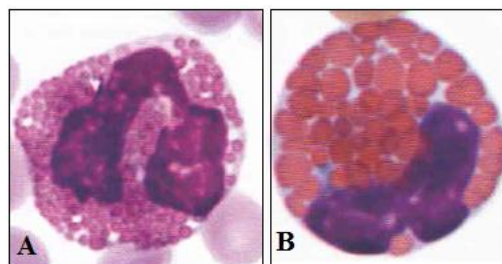
Výskyt velkých erytrocytů v krevním řečišti se označuje jako **makrocytární anémie**. Příčinou vzniku makrocytární anémie může být jaterní onemocnění nebo autoimunitní hemolytická anémie (AIHA). Ke zvětšování erytrocytů dochází při perniciózní anémii, což je anémie z nedostatku vitamínu B12.

### 2.3.2 Onemocnění bílé krevní řady

#### 2.3.2.1 Leukocytóza = zvýšený počet bílých krvinek v krevním řečišti

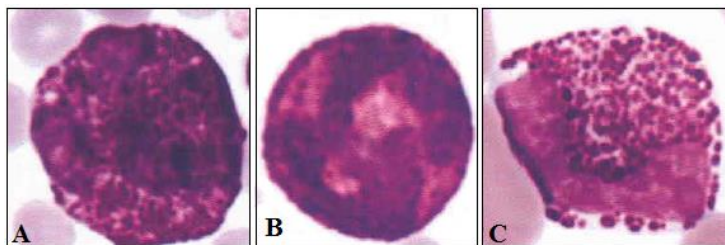
**Neutrofilie** se vyznačuje **zvýšeným počtem neutrofilů** v krevním řečišti. K tomuto zvýšení v organismu dochází při stresu, proto je nutné při odběru dbát na co nejšetrnější manipulaci se zvířetem. Dalšími důvody zvýšeného počtu neutrofilů jsou záněty, bakteriální infekce, nekrózy a šok. U skotu jsou citlivými ukazateli zánětové reakce proteiny akutní fáze - fibrinogen, haptoglobin (Hp), sérový amyloid (SAA).

Ke **zvýšení počtu eozinofilů** (Obr 11) neboli **eozinofilii** dochází při stresu. Hlavním důvodem zvyšování počtu eozinofilů v krvi je hypersenzitivita nebo napadení organismu parazity.



**Obr 12: Morfologie eozinofilů:**  
A - eozinofil u krávy; B - eozinofil u koně  
(zdroj: Harvey W. J., 2012)

**Basofilie** je charakterizována **zvýšeným počtem basofilů** (Obr 12) v krevním řečišti. Při jakémkoliv záchytu basofilů je třeba uvažovat o onemocnění. Důvodem zvýšení mohou být

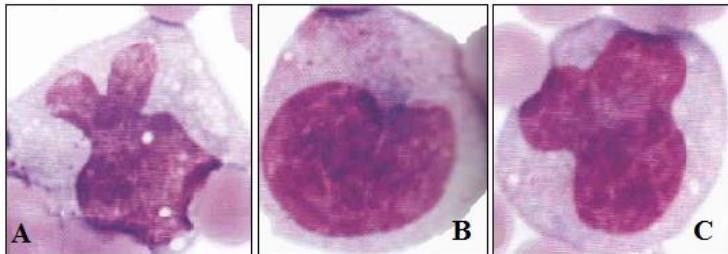


**Obr 13: Morfologie bazofilů:** A – bazofil u krávy; B – bazofil u kozy; C – bazofil u koně  
(zdroj: Harvey W. J., 2012)

parazitě, hypersenzitivita, aplikace některých léčivých přípravků, např. s obsahem penicilinu.

K **lymfocytóze** dochází při chronických infekcích. U mláďat je **zvýšený počet lymfocytů** v krevním řečišti po narození zcela fyziologickým stavem. Se zvyšujícím se věkem dochází k postupné úpravě a lymfocyty se vrací do normálu.

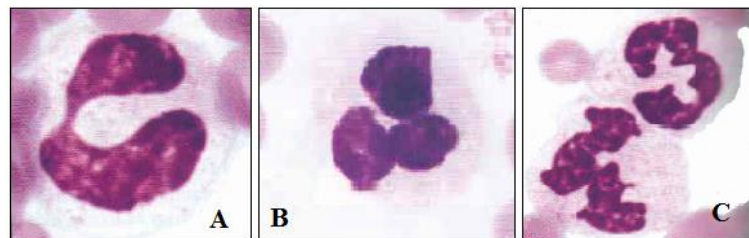
**Monocytóza** neboli **zvýšený počet monocytů** (Obr 13) v krevním řečišti je diagnostikována při zánětech, především hnisavých a nekrotických. U přežvýkavců se s monocytózou setkáváme např. při laminitidách a metritidách. Ke zvýšení také dochází při aplikaci léčiv např. kortikoidů. A dále se monocytóza může vyskytnout při tumorech.



**Obr 14: Morfologie monocytů:**  
**A, B – monocyt u koně;**  
**C – monocyt u krávy**  
 (zdroj: Harvey W. J., 2012)

### 2.3.2.2 Leukopénie = snížený počet bílých krvinek v krevním řečišti

**Neutropenie** se vyznačuje **sníženým počtem neutrofilů** (Obr 14) v krevním řečišti.



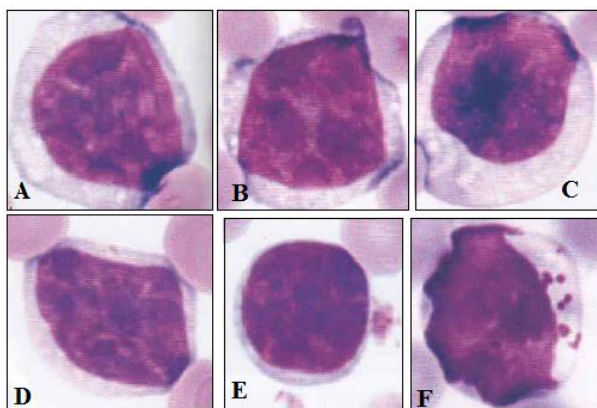
**Obr 15: Morfologie neutrofilů:**  
**A, B - neutrofil u krávy; C - neutrofil u koně**  
 (zdroj: Harvey W. J., 2012)

Ke snižování neutrofilů v organismu dochází v několika případech, a to především:

- při masivním vycestování neutrofilů do tkání - tato situace nastává při perakutních infekcích (mastitidy, metritidy)
- při zkráceném přežívání neutrofilů - toto nastává při septikémii, endotoxémii, perakutní infekci
- při poruchách granulopoezy - k tomu dochází při akutních virových infekcích

Diagnostický význam výskytu **eozinopenie** neboli **snížení počtu eozinofilů** v krvi je malý. Když už ke snížení dojde, bývá to zapříčiněno stresem, akutní infekcí nebo podáváním některých léčiv, např. kortikoidů.

Ke **snížení počtu lymfocytů** (Obr 15) v krevním řečišti (**lymfopenie**) dochází při akutních virových infekcích, imunodeficiencích a mykotoxikózách.



**Obr 16: Morfologie lymfocytů:**

A, B – středně velké až velké lymfocyty u krávy;  
 C – velký lymfocyt u krávy; D – středně velký lymfocyt u koně; E – malý lymfocyt u krávy;  
 F – granulární lymfocyt u krávy  
 (zdroj: Harvey W. J., 2012)

**Snížení počtu monocytů** v krevním řečišti je zjišťováno především při akutních zánětech. Diagnostický význam **monocytopenie** je malý.

**Posun jader doleva** nastává při akutních bakteriálních infekcích, hnisavých zánětech jako jsou pleuritidy, peritonitidy a hepatitidy. Při vzniku infekce jsou neutrofilové první buňky, které vycestují do místa zánětu. Dojde tedy k masivnímu množení, protože je jich potřeba velké množství, ale nejsou ještě plně zralé - segmentované. Mladá forma neutrofilu se nazývá tyčka.

**Tab 2: Referenční hodnoty hematologických parametrů u velkých zvířat**

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA	PRASE	KŮŇ
<b>Erythrocyty (RBC)</b>	$*10^{12}/l$	5,0 – 10,0	8,0 – 15,0	8,0 – 18,0	5,0 – 8,0	6,9 – 13,1
<b>Hematokrit (HCT)</b>	l/l	0,30 – 0,40	0,27 – 0,45	0,26 – 0,38	0,32 – 0,50	0,32 – 0,52
<b>Hemoglobin (HGB)</b>	g/l	90 – 140	90 – 150	80 – 120	100 – 160	112 – 194
<b>MCV</b>	fl	40 – 60	28 – 40	16 – 25	50 – 68	36 – 57
<b>MCH</b>	pg	11,0 – 17,0	8,0 – 12,0	5,0 – 8,0	-	12,0 – 20,0
<b>MCHC</b>	g/l	300 – 360	310 – 340	300 – 360	300 – 340	319 – 392
<b>Leukocyty (WBC)</b>	$*10^9/l$	6,0 – 12,0	4,0 – 12,0	4,0 – 13,0	11,0 – 22,0	5,6 – 14,8
<b>Trombocyty (PLT)</b>	$*10^9/l$	800 - 1100	800 – 1100	300 – 600	520	133 - 469



**Tab 3: Diferenciální rozpočet leukocytů - referenční hodnoty u velkých zvířat**

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA	PRASE	KUŇ
Neutrofilý – tyčky	%	0 – 2	0 – 1	0 – 1	0 – 4	0 – 1
Neutrofilý – segmenty	%	15 – 33	10 – 50	30 – 48	20 – 70	52 – 70
Lymfocyty	%	50 – 63	40 – 75	50 – 70	35 – 75	21 – 42
Monocyty	%	0,3 – 8	0 – 6	0 – 4	2 – 10	0 – 6
Eosinofily	%	0 – 20	0 – 10	1 – 8	1 – 15	0 – 1
Bazofily	%	0 – 2	0 – 3	0 – 1	0 – 3	0 – 2

### 3 Vyšetření kolostrální imunity

Vyšetření kolostrální imunity představuje u přežvýkavců speciální kapitolu. Jelikož se u nich vyskytuje placenta syndesmochorialis, nedochází k přenosu imunoglobulinů mezi matkou a plodem, a proto je nutný dostatečný přísun kolostra po narození mláďete. V prvních hodinách po porodu by tele mělo přijmout cca 3 litry kvalitního kolostra a do 24 hodin by množství přijatého mleziva mělo dosahovat již minimálně 10% jeho hmotnosti. Imunoglobuliny obsažené v kolostru mají schopnost prostupovat přes stěnu střeva do krevního oběhu krátkou dobu. Prostupnost trvá pouze několik hodin a nejdéle však 24 hodin po porodu. Poté se střevo uzavírá a imunoglobuliny a jiné prospěšné látky obsažené v podaném kolostru se již nevstřebávají. Proto včasné podání prvního kolostra, ideálně do 2 hodin po porodu, zaručuje vytvoření dostatečné a kvalitní imunity. Kolostrum neboli mlezivo se tvoří před porodem a jeho sekrece trvá zhruba 4 - 7 dní po porodu. Pro kvalitní vytvoření kolostra je nutné, aby kráva stála minimálně 6 - 8 týdnů na sucho. Po tuto dobu je oddělena zvlášť v sekci pro suchostojné krávy a nedojí se. Kolostrum se vyznačuje bohatým obsahem proteinů (významné jsou především imunoglobuliny z hlediska imunity), tuku,  $\beta$ -karotenu, vitamínu A, E, B2, minerálních látek (především hořčiku nezbytného pro odchod první stolice - meconia) a sníženým obsahem laktózy.

Vyšetření kolostrální imunity zahrnuje testy kvality napojení a kvality kolostra. Pro ověření účinnosti kolostra je nutné odebrat krev v rozmezí 2 - 5 dnů po porodu. Stanovení daných parametrů se provádí v krevním séru telat. V získaném séru se stanovuje koncentrace bílkovin, imunoglobulinů, vitamínu A a E a aktivita gama-glutamyltransferázy (GMT).

Nedostatečná kolostrální imunita se mimo jiné projevuje průjmovými onemocněními u mladších telat a respiračními problémy u telat starších.

Vyšetření kolostrální imunity lze rozdělit na dvě základní části:

- hodnocení kvality kolostra
- kontrola kolostrální výživy telat

#### 3.1 Preanalytická fáze

Stanovení parametrů sloužících k hodnocení kvality kolostra se provádí přímo ze vzorku kolostra. Úroveň kolostrální výživy telat se ověřuje kontrolou daných parametrů v krvi telat.

Většina parametrů lze stanovit z plazmy i séra, s výjimkou koncentrace celkových imunoglobulinů, které lze měřit pouze v séru telat.

### 3.1.1 Odběr vzorku

#### 3.1.1.1 Kolostrum

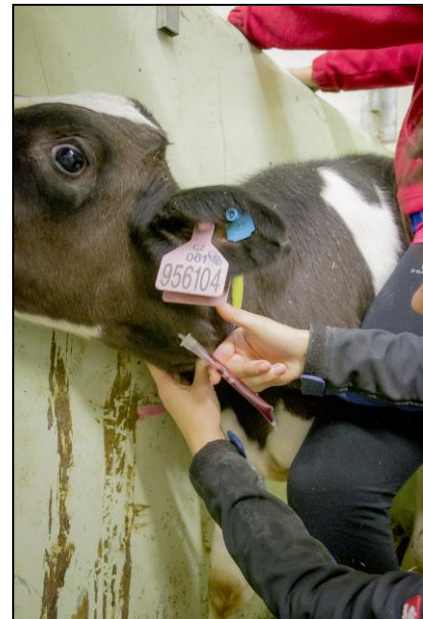
Kolostrum se odebírá do plastových uzavíratelných vzorkovnic (Obr 17). Vzorky je nutné uchovávat v chladu - v lednici (4 °C).



**Obr 17:**  
**Vzorkovnice s odebraným kolostrum**

#### 3.1.1.2 Sérum

Odběr krve se u telat provádí z v. jugularis (Obr 18) za použití odběrovky Hemos-02 bez antikoagulačního činidla nebo speciálních zkumavek s urychlovačem srážení (Obr 19). Odebrané vzorky krve se skladují při pokojové teplotě, aby došlo k vysrážení séra. Po odběru dochází k pozvolnému srážení krve, které probíhá v rozmezí 12 - 24 hod. Tento proces lze urychlit zvýšením teploty - srážení krve v termostatu při teplotě 37 °C.



**Obr 18:**  
**Odběr krve u telete**

Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobující hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- uchování vzorku při pokojové teplotě (18 - 25 °C)
  - nedodržení teploty → špatné srážení vzorku/hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny

Po sražení vzorku se sérum získá následnou centrifugací (10 min, 3000 ot/min). Sérum lze použít přímo ke stanovení, případně uchovat v lednici nebo pro pozdější užití lze zamrazit.



**Obr 19: Vhodný odběrový materiál pro odběr krve na sérum**

### 3.1.1.3 Plazma

Při vyšetření plazmy je nutno k odebranému vzorku přidat protisrážlivé činidlo. Jako antikoagulant se nejčastěji používá heparin. K odběru slouží komerčně vyrobené zkumavky potažené heparinem nebo hemosky či zkumavky s přidanými 2 - 3 kapkami heparinu.

Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobujících hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- promíchání krve ihned po odběru
  - pokud nedojde k promíchání antikoagulantu s krví, vzorek se srazí → vzorek nelze použít
- uchování vzorku v chladu - lednice (4 °C)



**Obr 20: Centrifuga MPW-350e**

Plazma se získá centrifugací vzorku po dobu 10 min při zrychlení 3000 ot/min (Obr 20).

Plazmu lze použít přímo ke stanovení, případně uchovat v lednici nebo pro pozdější užití lze zamrazit.

## 3.2 Analytická fáze

### 3.2.1 Hodnocení kvality kolostra

Nezákladnější a nejjednodušší metodou hodnocení kvality kolostra je **měření jeho hustoty kolostroměrem** (Obr 21). Hustota je vyjadřována v jednotkách  $\text{kg/m}^3$  a měří se v rozsahu 1035 - 1070  $\text{kg/m}^3$ .

**\*\*  $\rho$  (kolostrum) > 1050  $\text{kg/m}^3$  \*\***



Před měřením je důležité vzorek temperovat na pokojovou teplotu (20 - 23 °C) a pořádně promíchat. Nižší či vyšší teplota může vést ke značnému zkreslení výsledků. Při teplotě kolostra nižší než 20 °C jsou naměřené výsledky falešně vyšší a naopak. Hustoměr se vloží do odměrného válce nebo jiné vhodné nádoby s kolostrem a po ustálení se na stupnici odečte hodnota hustoty.

**Obr 21: Měření hustoty kolostra kolostroměrem**

**\*\* rozmrazování kolostra ve vodní lázni \*\***

**\*\* teplota max. 50 °C → denaturace bílkovin; zničení prospěšných látek důležitých pro imunitní výbavu \*\***

**Měření kvality kolostra** lze provést i **refraktometricky** za použití refraktometru.

Refraktometr (Obr 22) se obecně používá pro hodnocení kapalin a principem metody je měření indexu lomu. Ke stanovení stačí minimální objem mleziva (kapka) a výsledky nejsou závislé na jeho teplotě jako v případě kolostroměru - refraktometr je vybaven automatickou



teplotní kompenzací.

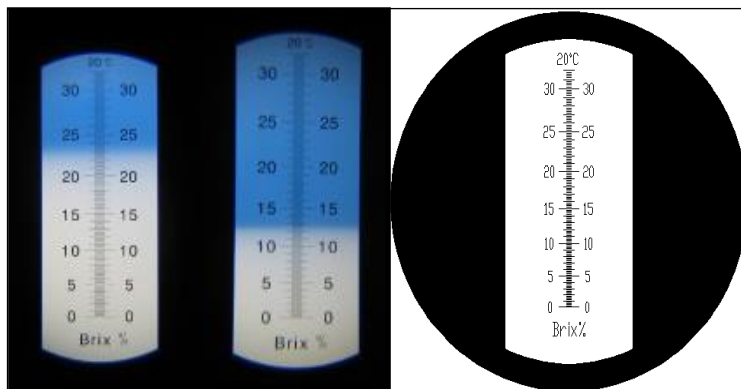
Po aplikaci vzorku se odečítá hodnota na stupnici proti světlu. Kvalita mleziva se hodnotí podle stupnice Brix v %. Rozmezí stupnice je 0 - 32 % (Obr 23).

**Obr 22: Refraktometr pro měření kvality kolostra**

**\*\* kvalitní mlezivo ... 22 % a více \*\***

**\*\* mlezivo průměrné kvality ... 18 - 21 % \*\***

**\*\* nekvalitní mlezivo ... 17 % a méně \*\***

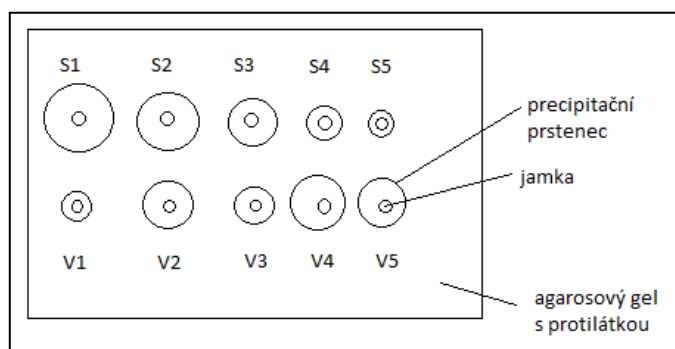


**Obr 23: Stupnice refraktometru pro měření kvality kolostra (Brix %); nekvalitní (vlevo) a kvalitní mlezivo (vpravo)**

(zdroj: <http://www.refraktometr.cz/rbr32-atc-univerzalni-refraktometr-brix-na-ovocne-stavy-a-mlecne-napoje>;  
<http://www.zootechnika.cz/clanky/chov-skotu/odchov-telat/mlezivova-vyziva-telat/kontrola-kvality-mleziva---refraktometr.html>)

### 3.2.1.1 Jednoduchá radiální imunodifúze (RID)

Koncentrace IgG1 v kolostru lze stanovit metodou jednoduché radiální imunodifúze (RID). Tato kvantitativní imunochemická metoda je založena na tvorbě imunoprecipitátů, které se vytvářejí po reakci antigenu (Ag) s protilátkou (Ab) a objevují se jako prstence kolem jednotlivých jamek (Obr 24).

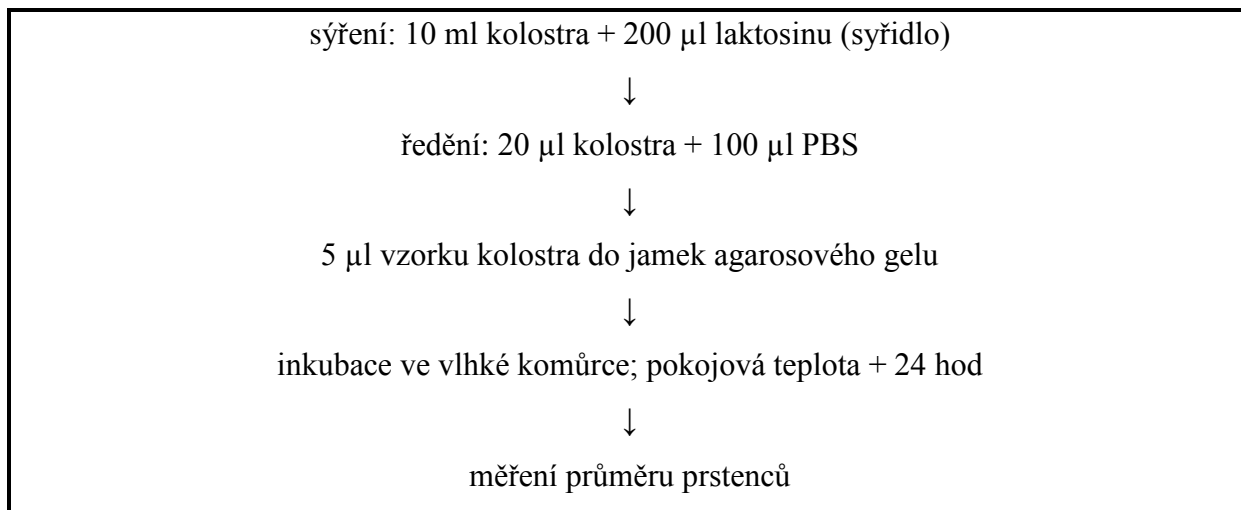


**Obr 24: Jednoduchá radiální imunodifúze**

Před samotným stanovením je nutné vzorky kolostra nechat vysrážet pomocí syřidla a následně naředit roztokem PBS (Phosphate Buffered Saline).

Takto upravené vzorky kolostra (Ag) jsou pipetovány do jamek v agarosovém gelu obsahujícím antisérum IgG1 (Ab). Během inkubace ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 24 hodin dochází k difundaci vzorku a tvorbě precipitačních linií ve tvaru kruhu. Průměr kruhu je úměrný koncentraci antigenu ve vzorku - IgG1 v kolostru. Kvantitativní analýza využívá metodu kalibrační křivky, podle které se vypočítá daná koncentrace IgG1.

Koncentrace IgG1 v kolostru je vyjadřována v jednotkách mg/g sušiny.



### 3.2.2 Kontrola kolostrální výživy telat

Mezi základní metody využívané ke kontrole kolostrální výživy telat patří přímé stanovení **koncentrace imunoglobulinů (IgG) v séru telat** i nepřímé metody zahrnující stanovení biochemických parametrů jako **koncentrace celkové bílkoviny (CB), aktivita gama-glutamyltransferázy (GMT), koncentrace vitamínů A a E**, které s kolostrální výživou souvisí. Stanovení parametrů se provádí v rozmezí 2 - 5 dnů po narození telat s výjimkou stanovení aktivity GMT, která se stanovuje nejpozději do 3. dne po porodu z důvodu rychlého poklesu aktivity do fyziologického rozmezí.

#### 3.2.2.1 Fotometrické stanovení imunoglobulinů (IgG) - zákalový test

Principem metody je vysrážení sérových imunoglobulinů roztokem síranu zinečnatého -  $ZnSO_4$  (Obr 25). Denaturace bílkovin způsobuje změny konformace a optických vlastností. Intenzita vzniklého zákalu je přímo úměrná koncentraci IgG a měří se fotometricky při vlnové délce 630 nm (Obr 26). Fotometry obsahují zdroj záření, optické prvky pro vedení paprsku přístrojem, prvek pro výběr vhodné vlnové délky k měření (monochromátor), zařízení pro vzorek (kyvetu) a detektor elektromagnetického záření. Výstupní zařízení ukazuje a vyhodnocuje signál detektoru.

** zdroj záření → monochromátor → kyveta → detektor → výstupní zařízení **
--

Přístroj se nastavuje na nulovou koncentraci analytu pomocí slepého srovnávacího vzorku - blanku před každým měřením.

** 50 $\mu$ l séra + 5 ml $ZnSO_4$ → nechat 1 h stát → měření **
--



**Obr 25: Příprava vzorku před fotometrickým měřením**

V této metodě se uplatňuje Lambert-Beerův zákon. Ten udává, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy.

$$A = \epsilon * c * l, \text{ kde}$$

c...molární koncentrace

$\epsilon$ ...molární absorpční koeficient

l...délka absorpční vrstvy

**\*\* c (IgG) > 12 - 15 g/l \*\***

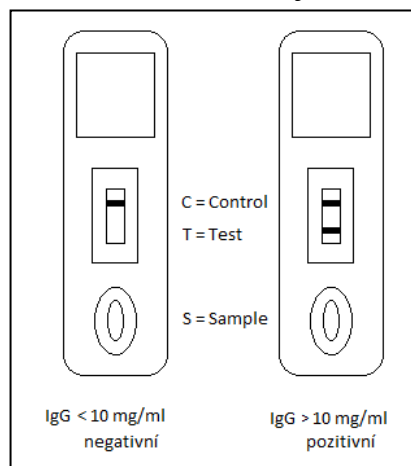
Koncentrace IgG je vyjadřována v jednotkách g/l.



**Obr 26: Měření koncentrace IgG na fotometru**

### 3.2.2.2 Stanovení koncentrace IgG pomocí IgG Quick Testu

Použití komerčního quick IgG testu (Plasma Calf IgG Mindland Quick Test Kit) umožňuje rychlé a orientační stanovení koncentrace IgG v krevní plazmě telat. Z toho důvodu je tento kvalitativní imunodiagnostický test založený na základním principu vazby antigen-protilátka využíván ke kontrole kolostrální výživy telat přímo v chovech. Je-li hladina imunoglobulinů v krevní plazmě telat dostatečně vysoká, je test pozitivní (Obr 27). Tato hladina se označuje jako citlivost testu. Test detekuje hodnoty IgG > 10 mg/ml.



**Obr 27: Vyhodnocení IgG Quick Test**



### 3.2.2.3 Stanovení celkové bílkoviny (CB)

Jednodušším a rychlejším způsobem stanovení koncentrace celkové bílkoviny je použití refraktometru (Obr 28). Refraktometrie je založena na měření indexu lomu.

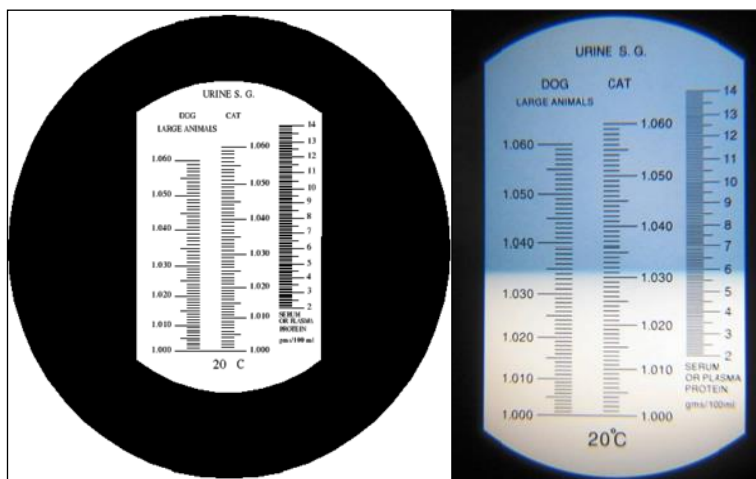


**Obr 28: Aplikace vzorku séra na hranol refraktometru**

Index lomu ( $n$ ) je závislý na koncentraci roztoku, proto je refraktometrie využívána jako kvantitativní analytická metoda a slouží k hodnocení různých druhů kapalin.

Ke stanovení stačí minimální množství krevního séra a po jeho aplikaci se odečte hodnota na stupnici proti světlu (Obr 29). Koncentrace celkové bílkoviny je vyjadřována v jednotkách g/100 ml. Druhým způsobem je stanovení koncentrace celkové bílkoviny na automatickém biochemickém analyzátoru Liasys. Zde je využito nejpoužívanější metody v biochemii - fotometrie (viz kap. 6 Biochemické vyšetření). Stanovení je provedeno za použití komerčního kitu od firmy BioVendor. Koncentrace celkové bílkoviny je vyjadřována v jednotkách g/l.

**\*\* c (CB) > 55 g/l \*\***



**Obr 29: Stupnice refraktometru pro měření koncentrace celkové bílkoviny (g/100ml)**

(zdroj: <http://www.refraktometr.cz/rur5-atc-refraktometr-pro-mereni-moci-psu-kocek-i-velkych-zvirat>  
<http://naschov.cz/pouziti-refraktometru-v-odchovu-telat-ii-hodnoceni-imunitni-vybavenosti-telat>)

### 3.2.2.4 Stanovení gama-glutamyl transferázy (GMT)

Stanovení aktivity enzymu GMT se využívá především k diagnostice jaterních onemocnění, nicméně je tento enzym obsažen ve vysoké koncentraci i v kolostru krav. Po napojení telete

kolostrem dochází ke vstřebávání enzymu do krve telat a jeho aktivita se zvyšuje. Aktivita enzymu GMT se stanovuje fotometrickou metodou, jejímž principem je měření absorpce světla vzorkem při dané vlnové délce. Spektrofotometrické stanovení je provedeno na automatickém biochemickém analyzátoru Liasys za využití komerčního kitu od firmy Erba Lachema (viz kap. 6 Biochemické vyšetření). Aktivita GMT je vyjadřována v jednotkách  $\mu\text{kat/l}$ .

**\*\* nenapojené tele kolostrem  $\rightarrow a(\text{GMT})$  je téměř nulová \*\***

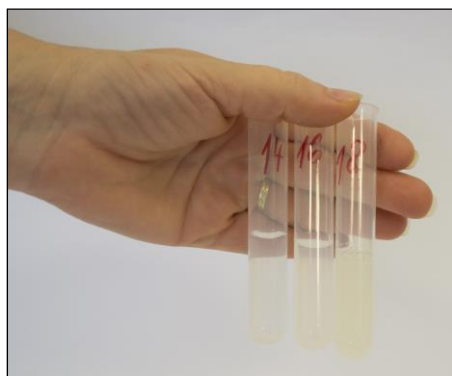
**\*\* dostatečně napojené tele kolostrem  $\rightarrow a(\text{GMT}) > 10 \mu\text{kat/l}$  \*\***

**\*\* napojené tele kolostrem  $\rightarrow a(\text{GMT}) > 15 \mu\text{kat/l}$  \*\***

### 3.2.2.5 Stanovení IgG - precipitační test

Mezi orientační zkoušky sloužící k hodnocení kolostrální výživy telat z hlediska stanovení obsahu IgG v krevním séru telat patří tzv. precipitační test. Jedná se o jednu ze starších metod sloužící k rychlé kontrole kolostrální výživy telete, kterou lze provést již 6 - 8 hodin po jeho napojení kolostrem. Při reakci roztoku siřičitanu sodného se vzorkem séra dochází ke vzniku sraženiny – precipitátu.

**\*\* 50  $\mu\text{l}$  séra + 5 ml  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   $\rightarrow$  nechat 1 h stát  $\rightarrow$  vyhodnocení \*\***



Roztok siřičitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) je připraven ve třech různých koncentracích - 14%, 16% a 18%. Vyhodnocení koncentrace IgG v séru telat se provádí na základě posouzení vzniklého precipitátu s různě koncentrovanými roztoky  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Obr 30).

**Obr 30: Posouzení vzniklého precipitátu s roztoky  $\text{Na}_2\text{SO}_3$**

**\*\* vznik precipitátu s 18% roztokem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   $\rightarrow c(\text{IgG}) < 5 \text{ g/l}$  \*\***

**\*\* vznik precipitátu s 18% i 16% roztokem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   $\rightarrow c(\text{IgG}) = 5 - 10 \text{ g/l}$  \*\***

**\*\* vznik precipitátu s 18%, 16% i 14% roztokem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$   $\rightarrow c(\text{IgG}) > 10 \text{ g/l}$  \*\***

### 3.2.2.6 Elektroforéza bílkovin

Elektroforéza patří mezi elektromigrační separační metody, jejímž principem je migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Nabité částice či molekuly se

pohybují k opačně nabitě elektrodě a neutrální částice/molekuly se nepohybují. Odlišná rychlost migrace složek ve vzorku vede k tvorbě oddělených zón jednotlivých složek.

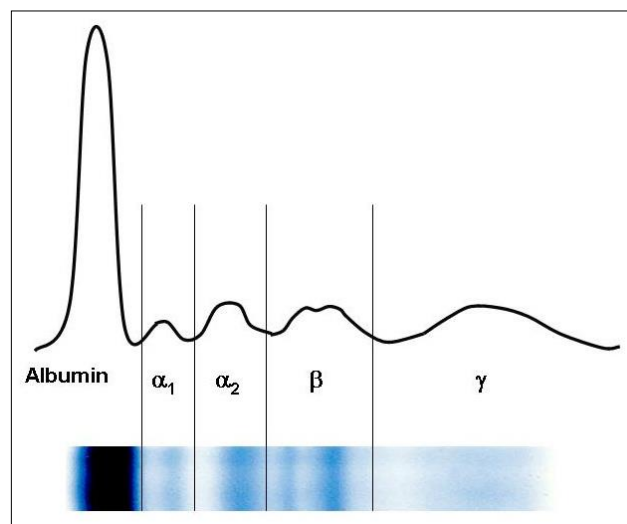
**\*\* záporně nabitě ionty = anionty se pohybují ke kladně nabitě elektrodě = anodě \*\***

**\*\* kladně nabitě ionty = kationty se pohybují k záporně nabitě elektrodě = katodě \*\***

Bílkoviny patří mezi amfolyty a mohou nabývat kladného i záporného náboje v závislosti na pH pufru, při kterém elektroforéza probíhá. Kladně nabitě molekuly proteinů se lépe adsorbují než záporně nabitě molekuly. Z toho důvodu jsou při elektroforéze proteinů využívány záporné náboje. Izoelektrický bod většiny sérových bílkovin je při pH 5 - 6, což znamená, že v alkalickém prostředí (pH 8,6) získají molekuly proteinů záporný náboj a budou se pohybovat k anodě. Albumin má nejvyšší negativní náboj a tím i nejrychlejší pohyblivost k anodě. Pomocí elektroforézy se sérové bílkoviny rozdělí na 5 - 6 frakcí: albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  frakce.  $\beta$  frakce se někdy rozdělí na frakci  $\beta_1$  a  $\beta_2$  (Obr 31).

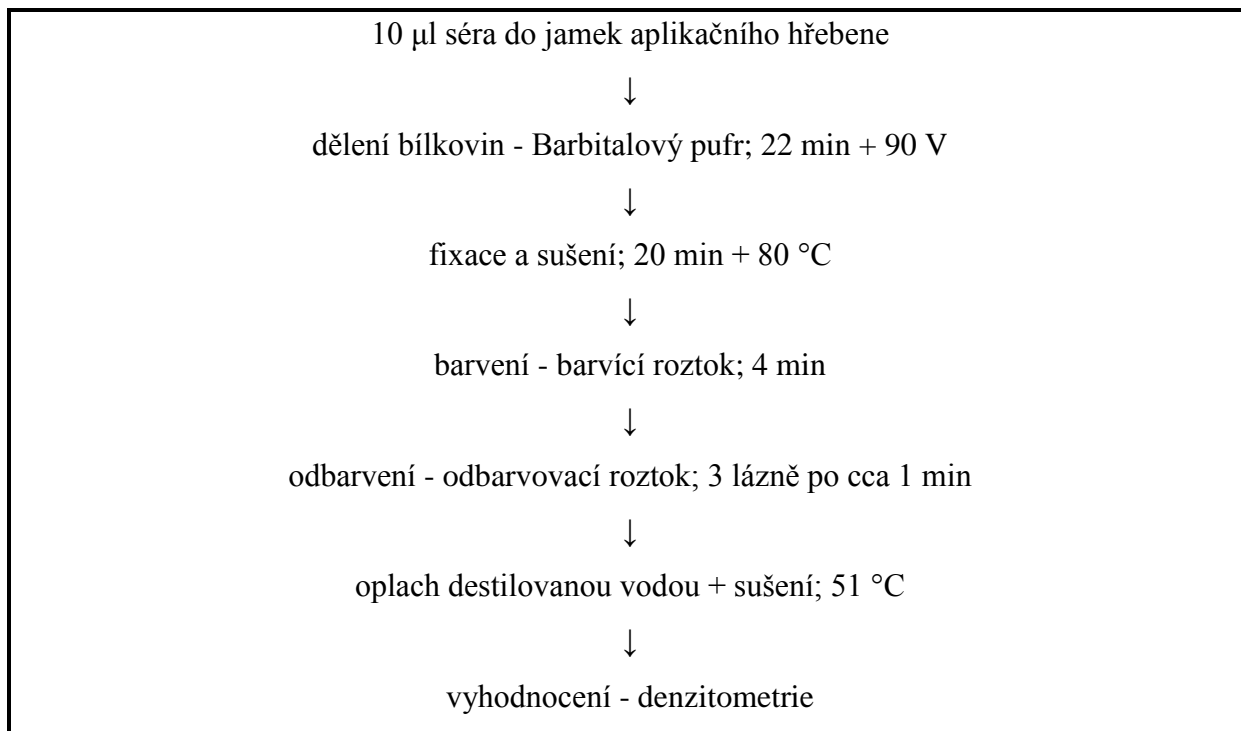
**\*\* stanovované látky - ionty nebo amfolyty \*\***

Elektroforéza bílkovin je prováděna za pomoci komerčního kitu od firmy Sebia (Obr 32). Při elektroforéze je používán agarosový gel jako nosič a tři základní roztoky - barbitalový pufr, barvicí roztok a odbarvovací roztok.

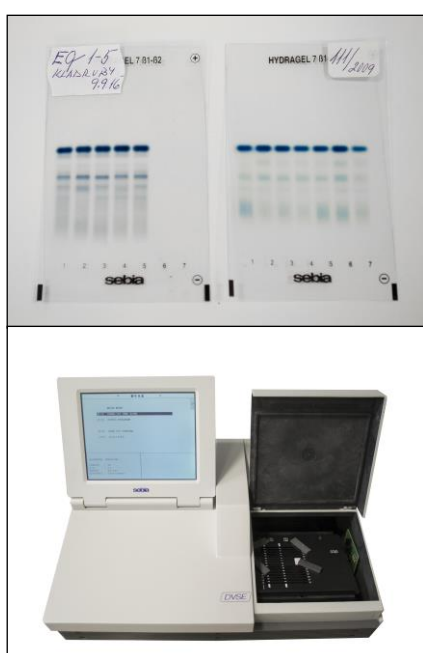


**Obr 31: Elektroforéza sérových bílkovin a elektroforegram**

(zdroj:<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Elektrofor%C3%A9za.jpg>)



**Obr 32: Aplikace vzorku séra, vztlínání vzorku séra do gelu, dělení bílkovin ve vyvíjecí komůrce**



Poloha jednotlivých frakcí a koncentrace bílkovin se hodnotí pomocí denzitometrie (Obr 33). Tato metoda je založena na měření intenzity záření procházejícího průhlednou plochou. Získaný grafický záznam fotometrovaného úseku tvoří v ideálním případě křivku zvonovitého tvaru (Obr 31). Plocha píků frakcí je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí. Hodnoty jednotlivých frakcí jsou vyjadřovány v % nebo v jednotkách g/l (Tab 4).

**Obr 33: Vyhodnocení elektroforegramu pomocí denzitometrie**

**\*\* albumin ... 30 - 42 g/l \*\***

**\*\*  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) ... 7,5 - 10,5 g/l \*\***

**\*\*  $\beta$  ... 8,0 - 13,8 g/l \*\***

**\*\*  $\gamma$  ... 16,2 - 26,0 g/l \*\***

### 3.2.2.7 Stanovení vitamínů A a E - kapalinová chromatografie

Jelikož vitamíny rozpustné v tucích téměř neprostupují placentou, dochází ke značnému nárůstu jejich koncentrace v krvi telat až po napojení kolostrem. Proto lze stanovení koncentrace vitamínů využít k hodnocení kvality kolostrální výživy telat.

**\*\* c (vit. A) > 0,7  $\mu$ mol/l \*\***

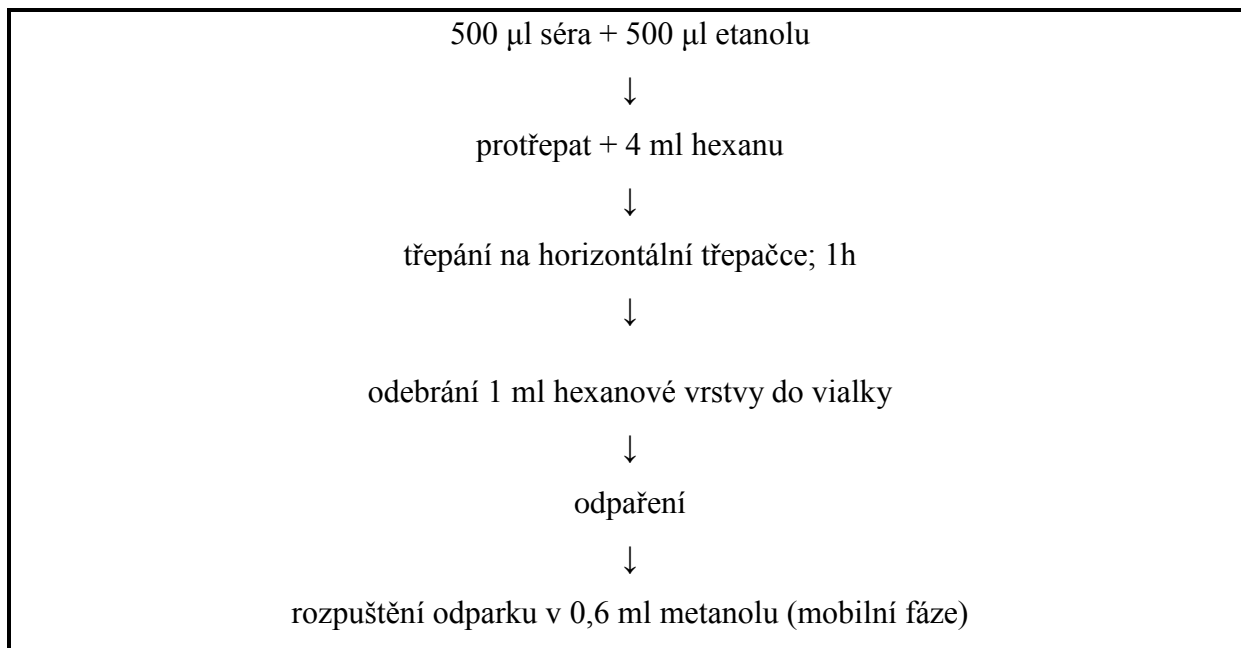
**\*\* c (vit. E) > 4,5  $\mu$ mol/l \*\***

Ke stanovení vitamínů A a E se využívá kapalinová chromatografie. Chromatografie obecně patří mezi metody separační. Vzorek se vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze - stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá) fáze a pohybem mobilní fáze je unášen přes fázi stacionární. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zadržovány a ty, které jsou poutány silněji, se při pohybu zdržují více. Tím dochází k separaci složek vzorku. Separace složek vzorku závisí nejen na jejich interakci se stacionární fází, ale i na použití mobilní fáze. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze je tvořena malými částicemi pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu a vedou k dosažení vysoké účinnosti separace → vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC (Obr 36). Při stanovení mohou být využity různé mechanismy separace - adsorpce, rozdělení na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo interakce na základě různé afinity. Pro stanovení vitamínů je nutné vzorek séra před samotným měřením

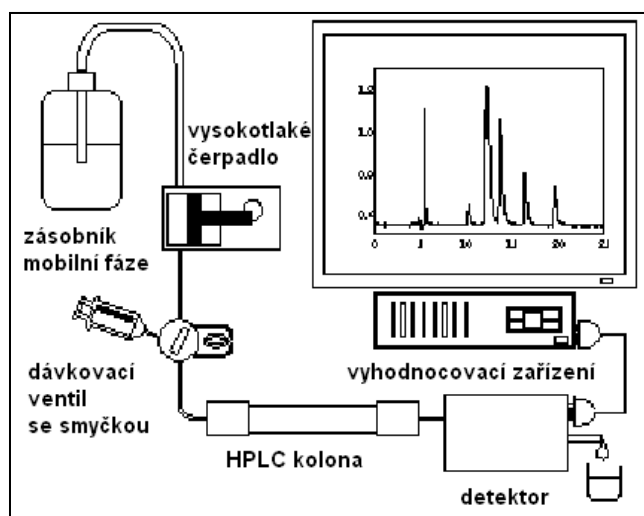


připravit daným způsobem a to jeho extrakcí, následným odpařením a rozpuštěním v mobilní fázi (Obr 34).

**Obr 34: Odpaření vzorku do sucha**



Vzorky jsou dávkovány ve velmi malém množství (20  $\mu$ l) vysokotlakým dávkovacím ventilem do mobilní fáze - metanol. Jednotlivé složky vzorku jsou mobilní fází unášeny na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru (Obr 35). Měřenou veličinou je fluorescence. Výstupem z detektoru je chromatogram, který vyjadřuje závislost odezvy detektoru na retenčním čase (Obr 37). Hodnotí se plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí metodou kalibrační křivky, která spočívá v přípravě standardních roztoků o známých rostoucích koncentracích a proměření jejich odezvy příslušnou měřicí metodou. Vytvořená kalibrační křivka slouží k přepočtu naměřené fluorescence vzorku na koncentraci prvku ve vzorku.



**Obr 35: Schéma kapalinového chromatografu**  
 (zdroj: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>)

*Vysokotlaké čerpadlo* - zajišťuje konstantní bezpulsní průtok mobilní fáze (průtok 1,2 ml/min)  
*Směšovací zařízení* - zajišťuje složení mobilní fáze → stálé (izokratická eluce) nebo měnné (gradientová eluce)

*Dávkovací zařízení* - automatický dávkovač je spojený se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny vialky uzavřené pryžovým septem; vzorek je dávkován pomocí několika ventilů přímo do mobilní fáze; prostor pro vzorky je temperován a chráněn před světlem

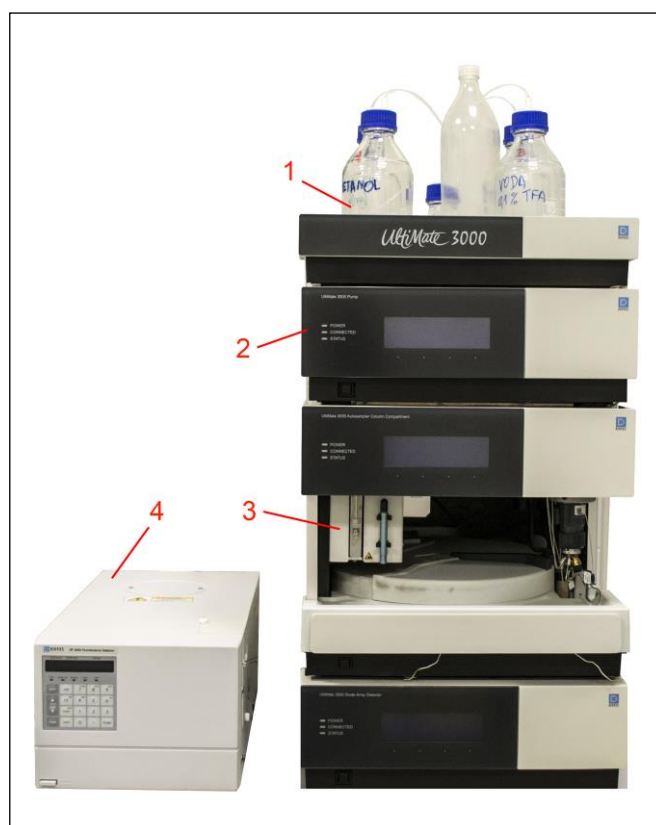
*Kolona* - kolona Acclaim 120, C18 (3  $\mu$ m, 4,6 x 100mm); zajištění separace směsi na jednotlivé složky

*Detektor* - fluorescenční detektor; detekce analytů v mobilní fázi:

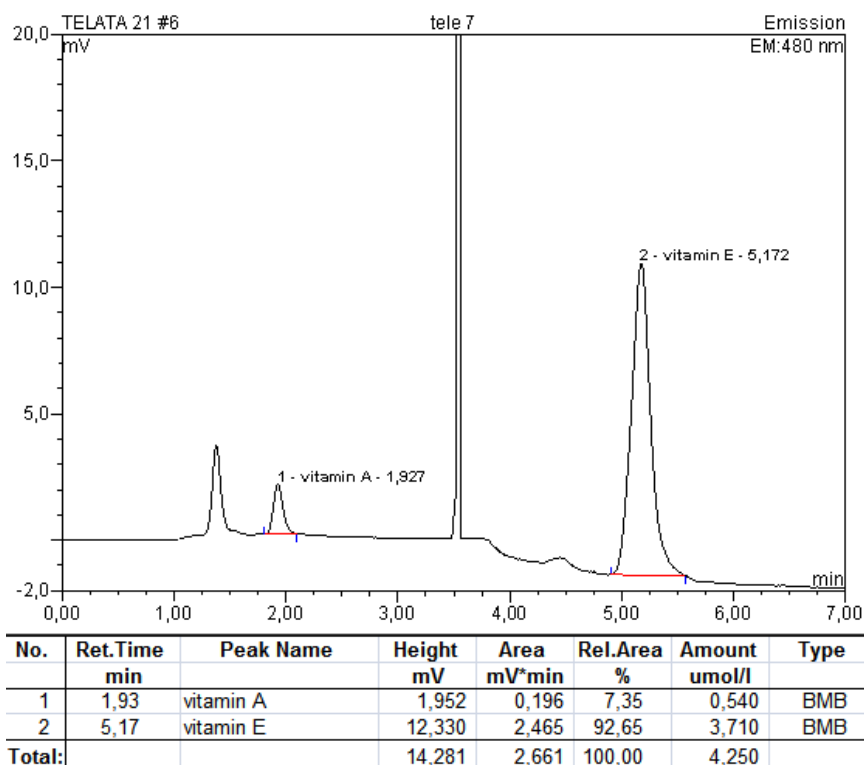
vlnová délka pro detekci - vitamín A: excitační  $\lambda$  = 325 nm, emisní  $\lambda$  = 480 nm

vitamín E: excitační  $\lambda$  = 292 nm, emisní  $\lambda$  = 325 nm

*Vyhodnocovací zařízení* - zpracování signálu z detektoru  $\rightarrow$  chromatografická křivka = chromatogram



**Obr 36: Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 DIONEX. (1) zásobník mobilní fáze; (2) čerpadlo; (3) autosampler ACC; (4) detektor FLD - fluorescenční**



**Obr 37: Chromatogram - stanovení koncentrace vitamínů u telat**

### 3.3 Postanalytická fáze

Novorozená telata disponují nevyvinutým imunitním systémem, a proto je pro jeho dovybavení nutný příjem dostatečného množství kvalitního kolostra ihned po narození. Příjem kolostra má zásadní vliv na zdraví a přežívání telat od porodu až do odstavu. Mimo okamžitý prospěch pro zdraví telete a jeho další život se správná kolostrální výživa podepisuje i na intenzitě růstu, vývoji orgánů (srdce, játra, plíce), konverzi krmiva, reprodukčních parametrech a mléčné užitkovosti v dospělosti.

Kvalita kolostra je ovlivněna krmnou dávkou, pořadím laktace, ošetřením vemene při zasušení, délkou období stání na sucho, časem prvního nadojení po porodu, množstvím vyprodukovaného kolostra při prvním nádoji a pohodou neboli welfare zvířete. Optimální délka období stání na sucho je 6 - 8 týdnů před předpokládaným porodem. To je dostatečně dlouhá doba na to, aby se mléčná žláza zregenerovala z předchozí laktace a měla čas na vytvoření kvalitního kolostra. Pohodou zvířat je především myšleno ustájení v předporodních boxech. Boxy jsou většinou společné pro několik krav dohromady. Měly by být udržené v co největší čistotě a neměly by se přepřňovat. Pořadí laktace je pro kvalitu kolostra důležitá. Dojnice - multipary mají kvalitnější kolostrum než jalovice. Je to ovlivněno tím, že kráva se setkala s vícero patogeny, a proto má lepší imunitní výbavu, kterou může předat do kolostra.



Čas prvního nádoje ovlivňuje kvalitu kolostra především v hustotě. Čím později po porodu se kráva podojí, tím dříve se kolostrum v mléčné žláze začne ředit a tím pádem bude mít nižší hustotu. Optimální množství kolostra při prvním nádoji je okolo 4 - 6 litrů.

Krmná dávka musí obsahovat vyvážený poměr vitamínů, mikroprvků a makroprvků.

Důležitou složkou potravy u vysokobřezích krav jsou bílkoviny, vitamín A a E a minerální látky (Ca, P, Mg, Zn, Cu, Se). Vitamíny rozpustné v tucích nedokážou přecházet přes placentu, proto je kolostrum nezbytně nutné, aby se vitamíny vstřebaly do organismu.

Deficit i nadbytek proteinů v krmné dávce působí na kvalitu kolostra negativně.

Překrmováním dusíkatými látkami dochází k tomu, že se dusíkaté látky neutilizují a přebytečný amoniak se resorbuje do krve. Vysoká koncentrace amoniaku v krvi vyvolá azotémii a dusíkaté zplodiny ovlivňují vyvíjející se plod, vyvolávají imunosupresi krávy, omezují tvorbu imunoglobulinů, zhoršují kvalitu kolostra a následně dochází k imunodeficienci neonatálních telat.

Negativní vliv na kvalitu kolostra mají i mykotoxiny, které se vyskytují v krmivech narušenými hnilobou a plísní - tedy zkrmování nekvalitní siláže a senáže. Mykotoxiny se vylučují kolostrem a snižují v něm koncentraci imunoglobulinů.

Kolostrum je velice cenná tekutina, která je složena z bílkovin, cukrů, tuků, vitamínů, minerálů, imunoglobulinů, cytokinů, enzymů, peptidů, nukleotidů, růstových faktorů, hormonů a buněk. Imunoglobuliny kravského mleziva jsou IgG1, IgG2, IgA a IgM. Cytokiny (IL-1beta, IL-6, TNF, IGn-gama) jsou důležitou složkou kolostra pro funkci imunologických hormonů. Buňky obsahující kolostrum jsou mateřské leukocyty: makrofágy, neutrofilů a lymfocyty.

Nedostatečné a opožděné napojení telete kolostrem může vést k řadě onemocnění. Příjem adekvátního množství vysoce kvalitního kolostra je nutností. Absorpce kolostra u novorozených telat je zajištěna střevními buňkami prostřednictvím receptorů a pomocí endocytózy. Absorpční kapacita se začne snižovat 6 - 12 hodin po porodu a je ukončena 48 hodin po porodu. V současné době je doporučováno podávat alespoň 3l kolostra do 2 hodin po narození. Tím je zajištěn dostatečný přísun imunoglobulinů a to 150 - 200g.

### 3.3.1 Poruchy metabolismu

Mezi poruchy zdravotního stavu telat z důvodu nedostatečné kolostrální výživy se řadí **poruchy metabolismu – hypoproteinémie, hypogamaglobulinémie, hypovitamínózy a karence mikroprvků** vyskytující se v časném období. Klinickými projevy jsou pomalý růst, snížená vitalita, špatná kvalita srsti a poruchy pohybového aparátu a další. Významný je

nedostatek selenu, který způsobuje tzv. svalovou nutriční dystrofii. Projevuje se to celkovou slabostí mláďete, ochabnutím svalů, takže tele na nás působí jako hadrové a není schopné samo vstát. Postiženy jsou i svaly jazyka a mláďe není schopno sát kolostrum. Dochází také k vrozeným kardiomyopatiím, které se odhalí až při pitvě, kdy jsou výrazné změny v srdci, především na myokardu - velmi slabá stěna a vzhled vařeného masa.

### 3.3.2 Výskyt infekčních onemocnění

Důsledkem poruch kolostrální výživy telat je především zvýšený **výskyt infekčních onemocnění**. Z důvodu neobsazení absorpčních míst na sliznici střevní kolostrálními protilátkami dochází k prostupu patogenů a rozvíjení septikemie, způsobené především *E.coli* nebo průjmových onemocnění u telat. Tato onemocnění jsou hlavní příčinou vysoké morbidity a mortality telat. Neinfekční průjmy jsou nejčastěji vyvolány dyspepsií telat, která se vyznačuje poruchou sekrece, resorpce a motoriky slezu a střev s následným nechutenstvím, průjmy a rychle se rozvíjející dehydratací.

Příčinou infekčních průjmových onemocnění, které patří mezi častěji se vyskytující a i závažnější, jsou smíšené infekce virů bakterií, protozoí a plísní. Infekční průjmová onemocnění se projevují při působení mnoha vlivů prostředí a nedostatečné kolostrální imunitě. Za nejčastější původce průjmů u telat jsou považovány rotaviry (50 % případů). Průjem způsobený rotaviry se u telat vyskytuje několik dní po narození. Průjmy vyvolané koronaviry postihují cca jednotýdenní telata. Rozsah výskytu je 3 - 20 %. Koronaviróza má těžší průběh, protože rozrušuje buňky enterocytů a dochází až ke krvavým průjmům. Mezi další viry vyskytující se u průjmových telat patří virus BVD (bovinní virová diarrhea), IBR (infekční bovinní rinotracheitída), adenoviry, astroviry, parvoviry a jiné. Při virových onemocnění hrozí velké riziko sekundární bakteriální infekce. Z bakterií se uplatňuje *E.coli*, *Salmonella* sp. *Campylobacter* sp. a další. Z parazitárních původců se uplatňují cryptosporidie, kokcidie a giardie. Kryptosporidie a kokcidie jsou nejčastějším protozoárním původcem průjmu u telat. *Cryptosporidium* sp. se u telat vyskytuje od čtvrtého do čtrnáctého dne věku. Hlavními klinickými příznaky jsou profuzní vodnaté průjmy a těžká dehydratace organismu. Kokcidióza se vyskytuje u telat ve stáří šesti týdnů až čtyř měsíců, nejčastěji v období přechodu na rostlinnou výživu. V chovech s nízkou hygienickou úrovní její výskyt přetrvává až do osmi měsíců stáří zvířat. Klinickými příznaky jsou krvavé průjmy.

## 4 Vyšetření bachorové tekutiny

K vyšetření bachorové tekutiny (BT) přistupujeme při kontrole výživy a bachorové fermentace, při diagnostice bachorových dysfunkcí, při zjištění snížené užitkovosti při odpovídající krmné dávce nebo při změně ve složení mléka (pokles tuku nebo bílkoviny) a při zvýšené nemocnosti paznehtů.

V rámci preanalytické fáze se provádí odběr BT bachorovou sondou nebo rumenocentézou - punkce ventrálního kaudálního bachorového vaku. Vyšetření bachorové tekutiny lze rozdělit na vyšetření fyzikálních a chemických parametrů. Fyzikální - smyslové vyšetření zahrnuje posouzení barvy, zápachu, konzistence, sedimentace a flotace. Mezi chemické parametry sloužící k posouzení bachorové tekutiny se řadí stanovení pH, celkové acidity, koncentrace těkavých mastných kyselin (TMK), kyseliny mléčné, amoniaku a také vyšetření bachorových mikroorganismů - počet nálevníků.

### 4.1 Preanalytická fáze

#### 4.1.1 Odběr vzorku

Odběr bachorové tekutiny lze provést dvěma způsoby - neinvazivně perorálně zavedenou sondou nebo invazivně přímou punkcí bachoru.



**Obr 39: Odběr BT pomocí sondy**

Nejčastěji užívaným způsobem je perorální odběr BT pomocí sondy (Obr 39). Sondy s kovovými hlavicemi s otvory odsávají BT z ventrálního bachorového vaku pomocí vhodného vakuového zařízení (Obr 38).

**Obr 38:  
Sonda pro odběr BT**

Další možností, vedle již zmiňovaného odběru sondou per os, je přímý odběr BT



jehlou přes stěnu břišní.

BT je nasávána do stříkačky z kaudovětrálního bachorového vaku dostatečně dlouhou jehlou (Obr 40). Tato metoda sebou nese jistá rizika, a to především možnost kontaminace dutiny břišní při vytahování jehly ven. Pokud se bachorová tekutina dostane do dutiny břišní, hrozí



**Obr 40: Odběr BT punkcí**

riziko vzniku peritonitidy. Bachorová tekutina se odebírá do uzavíratelných vzorkovnic nejlépe 3 - 4 hodiny po začátku krmení. Parametry vyšetřované přímo ze vzorku BT (pH, celková acidita) je nutné stanovit co nejdříve po odběru. V případě zakonzervování BT, což je nezbytné pro stanovení některých parametrů, lze vyšetření provést i později (viz jednotlivá stanovení parametrů). Nativní bachorová tekutina se uchovává při 4 °C max. 24 hodin. Bachorovou tekutinu s použitím konzervans je nutné zpracovat do 48 hodin.

## 4.2 Analytická fáze

### 4.2.1 Fyzikální parametry bachorové tekutiny

Základním vyšetřením bachorové tekutiny je stanovení fyzikálních parametrů, mezi které se



**Obr 41: Sedimentace a flotace BT**

řadí smyslové **posouzení barvy, zápachu, konzistence, sedimentace a flotace** (Tab 4). Za fyziologických podmínek je barva bachorové tekutiny olivově zelená, zápach typicky aromatický a konzistence slabě viskózní. Barva a zápach je ovlivněna krmivem, které dojnice přijímají (Obr 42). Proto je při hodnocení nutné vědět složení krmné dávky. Sedimentace a flotace je pozorována ve skleněném odměrném válci.

řadí smyslové **posouzení barvy, zápachu, konzistence, sedimentace a flotace** (Tab 4). Za fyziologických podmínek je barva bachorové tekutiny olivově zelená, zápach typicky aromatický a konzistence slabě viskózní. Barva a zápach je ovlivněna krmivem, které dojnice přijímají (Obr 42). Proto je při hodnocení nutné vědět složení krmné dávky. Sedimentace a flotace je pozorována ve skleněném odměrném válci.



**Obr 42: Posouzení barvy BT**

#### 4.2.2 Chemické parametry bachorové tekutiny

Mimo základní fyzikální parametry se k diagnóze bachorových onemocnění využívají i parametry chemické (Tab 4, 5). Hlavním a důležitým parametrem pro posouzení fermentačních procesů v bachoru je **stanovení pH**. Hodnota pH poukazuje na rovnováhu nebo dysbalanci mezi dvěma skupinami metabolitů - kyselinami (těkavé mastné kyseliny a kyselina mléčná) a zásadami (amoniak a další alkalické látky). Stanovení pH BT lze provést přímo v terénu pomocí nakalibrovaného kapesního pH metru (Obr 43) nebo za použití titrátoru TitroLine Easy v laboratoři.

Obr 43:  
Kapesní pH metr



Doplňujícím ukazatelem kyselosti bachorového obsahu je **celková acidita**. Stanovuje se titrací 10 ml bachorové tekutiny roztokem 0,1 M NaOH. Titrace se provádí na titrátoru



TitroLine Easy od stanoveného pH až do hodnoty 8,45 - 8,50 (Obr 44). Hodnota celkové acidity je vyjadřována v titračních jednotkách (množství spotřebovaného 0,1 M roztoku NaOH).

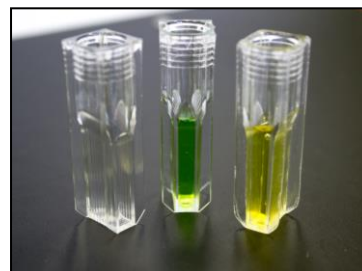
Parametry je důležité stanovit co nejdříve po odběru bachorové tekutiny a vzorek BT dostatečně promíchat.

Obr 44:  
Titrátor TitroLine Easy

Mezi další chemické parametry sloužící k posouzení bachorové tekutiny patří **koncentrace amoniaku**, která slouží jako ukazatel úrovně metabolismu dusíkatých látek bílkovinné i nebílkovinné povahy. Stanovení amoniaku se provádí fotometrickou metodou za použití komerčního kitu UREA/BUN - COLOR od firmy BioSystems (Obr 46).

\*\* zdroj záření → monochromátor → kyveta  
→ detektor → výstupní zařízení \*\*

Obr 45:  
Kyvety se vzorkem



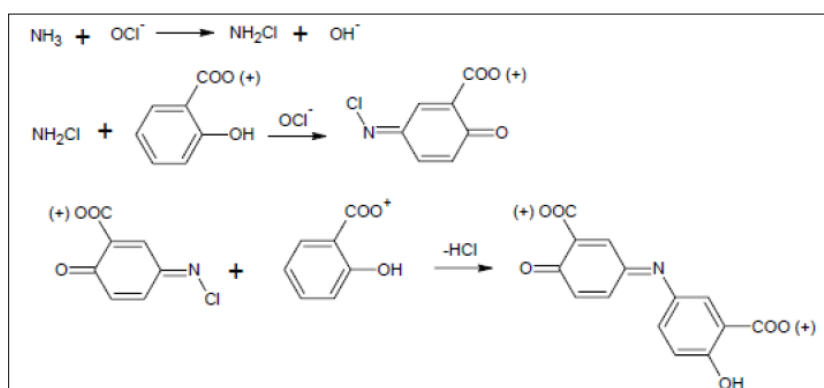
Fotometry obsahují zdroj záření, optické prvky pro vedení paprsku přístrojem, prvek pro výběr vhodné vlnové délky k měření, zařízení pro vzorek – kyvetu (Obr 45) a detektor elektromagnetického záření. Výstupní zařízení ukazuje a vyhodnocuje signál detektoru. Před



**Obr 46: Komerční kit UREA/BUN - COLOR**

stanovením je důležité vzorek BT odstředit a pro měření použít odebraný supernatant. Principem indofenolové metody je reakce amoniaku ( $\text{NH}_3$ ), chlornanu sodného ( $\text{NaOCl}$ ) a salicylanu sodného v alkalickém prostředí za vzniku indofenolu.

Nitroprusid sodný, který katalyzuje níže uvedenou reakci, je transformován na žlutý pentakynoželezatan sodný. Žlutá barva s indofenolovou modří vedou ke vzniku zeleného zabarvení výsledného produktu reakce (Obr 47).



**Obr 47: Princip indofenolové metody**

Vzniklý barevný produkt je měřen při vlnové délce 630 nm (Obr 48). Přístroj se nastavuje na nulovou koncentraci analytu pomocí slepého srovnávacího

vzorku - blanku před každým měřením. V této metodě se uplatňuje Lambert-Beerův zákon. Ten udává, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy.

$$A = \varepsilon * c * l, \text{ kde}$$

$\varepsilon$ ...molární absorpční koeficient

$c$ ...molární koncentrace

$l$ ...délka absorpční vrstvy



**Obr 48: Fotometrické stanovení koncentrace amoniaku**

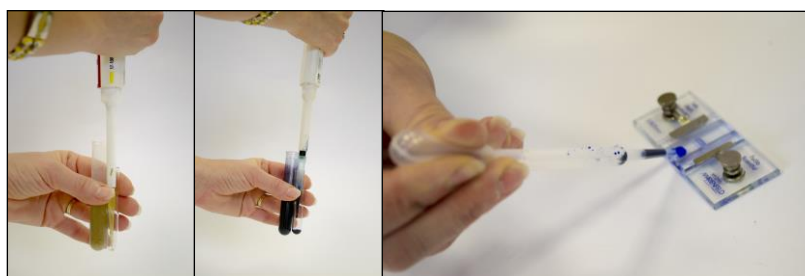
Koncentrace  $\text{NH}_3$  je vyjadřována v jednotkách mmol/l.

**\*\* 5  $\mu\text{l}$  BT + 500  $\mu\text{l}$  reagensie A + 500  $\mu\text{l}$  reagensie B  $\rightarrow$  nechat 20 min stát  $\rightarrow$  měření \*\***

**Počet nálevníků** je významným ukazatelem charakteru prostředí předžaludků. Ke stanovení jejich počtu respektive aktivity při fermentačních procesech v bachoru se využívá barviva - methylenové modři. Aktivita nálevníků je určena na základě posouzení jejich pohyblivosti a schopnosti redukovat methylenovou modř (odbarvení modrého zbarvení). Toto rychlé vyšetření nativního vzorku BT slouží k orientačnímu stanovení a lze ho tedy provádět i v terénu. Pro mikroskopické stanovení počtu nálevníku je nezbytné vzorek bachorové tekutiny konzervovat z důvodu stále probíhající fermentace, která má za následek ovlivnění výsledku měření. Konzervace BT se provádí za použití roztoku 10% formaldehydu. Zakonzervovaný vzorek BT se poté obarví methylenovou modří a kápne se přímo do komůrky (Obr 49).

**\*\* konzervace: 4 ml BT + 1 ml 10% formaldehydu \*\***

**\*\* 25  $\mu\text{l}$  zakonzervované BT + 475  $\mu\text{l}$  methylenové modři \*\***



**Obr 49:**  
**Příprava vzorku**  
**před stanovením počtu**  
**nálevníků**

Stanovení počtu nálevníků je prováděno ve Fuchs-Rosenthalově komůrce mikroskopicky při zvětšení 10x (Obr 50, 51) a vyhodnocuje se dle vzorce:

$$X = Y * 320 * 20 * 1,25, \text{ kde}$$

X ... počet nálevníků v 1 ml BT

Y ... počet nálevníků ve všech polích Fuchs-Rosenthalovy komůrky

320 ... index komůrky

20 ... ředění BT methylenovou modří

1,25 ... ředění BT konzervačním roztokem



**Obr 50: Mikroskopické stanovení**  
**počtu nálevníků**



Počet nálevníku je vyjadřován v jednotkách počet nálevníků/ml.

**Obr 51: Ukázka různých druhů nálevníků**

(zdroj: Crha, 1980)

**Těkavé mastné kyseliny (TMK)** jsou produktem trávení sacharidů v bacheru a jejich stanovení slouží k diagnóze bacherových dysfunkcí. Pro posouzení fermentace je důležité zastoupení jednotlivých mastných kyselin - **kyselina octová, propionová, máselná a mléčná**. Stanovení TMK se provádí za použití plynové chromatografie (Obr 54) a kapilární izotachoforézy, která se využívá hlavně pro stanovení kyseliny mléčné (laktátu).

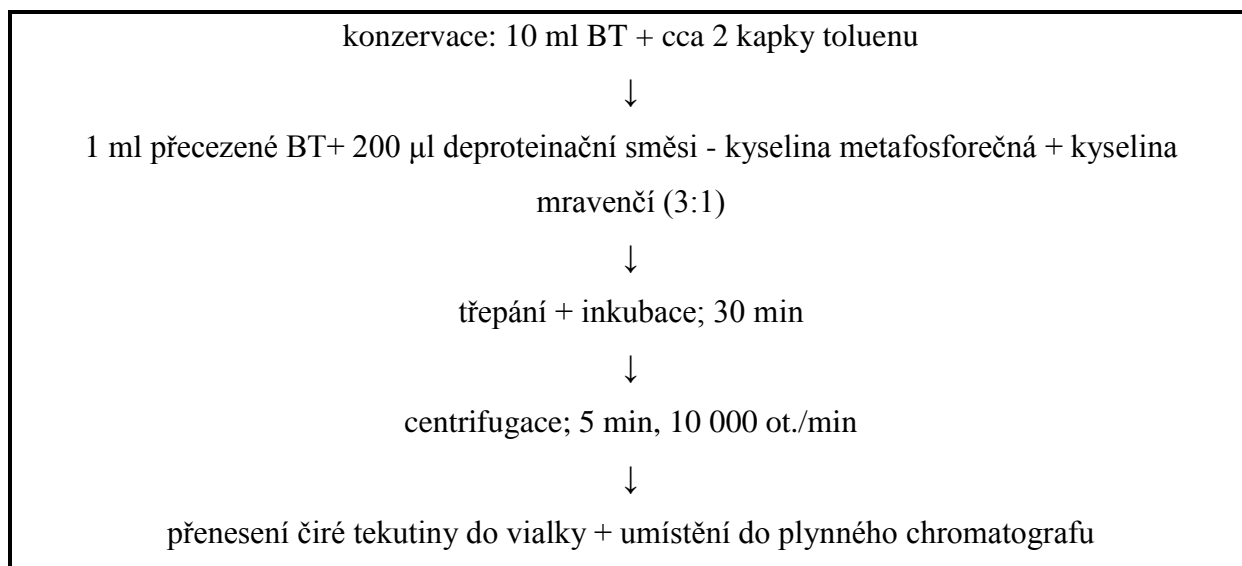


**Obr 52: Roztoky ke konzervaci BT**

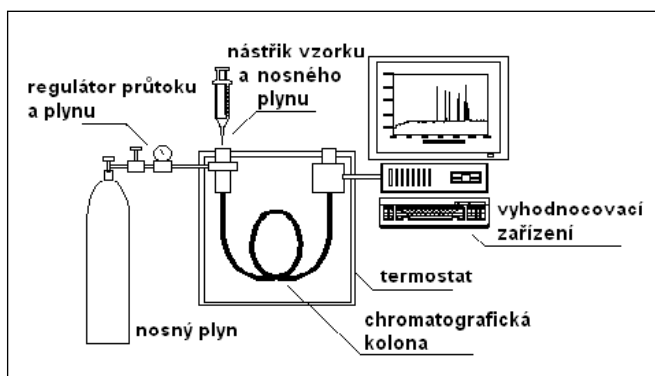
Chromatografie obecně patří mezi metody separační. Vzorek se vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze - stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá) fáze a pohybem mobilní fáze je unášen přes fázi stacionární. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zadržovány a ty, které jsou poutány silněji, se při pohybu zdržují více. Tím dochází k separaci složek vzorku. V případě plynové chromatografie je mobilní fází plyn.

Samotnému stanovení na plynovém chromatografu předchází příprava vzorků bacherové tekutiny, mezi kterou patří i jejich zakonzervování pomocí toluenu (Obr 52). Tento krok je důležitý z důvodu stále probíhající fermentace jako v případě stanovení počtu nálevníků.





Nosný plyn - dusík je odebírán z tlakové láhve a přes regulační systém přichází do nástřikové komory - injektoru. Průtok mobilní fáze musí být optimalizován tak, aby se dosáhlo co nejlepšího rozdělení látek na koloně. Nosný plyn prochází po celou dobu stanovení kolonou se stacionární fází. Vzorek je dávkován (1 µl) do proudu plynu v nástřikové komoře a ihned po dávkování je přeměněn na plyn (injektor je vyhříván na danou teplotu potřebnou k okamžitému zplynění vzorku). Ve formě par je vzorek dále unášen nosným plynem do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku (Obr 53). Složky ze vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Složky vzorku se separují dle schopnosti poutat se na stacionární fázi. Nosný plyn z kolony vstupuje do detektoru, který indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Principem ionizačně plamenového detektoru je měření změny elektrické vodivosti vodíkového plamene způsobené přítomností eluované organické látky. Vstoupí-li do detektoru s nosným plynem látka spalitelná ve vodíkovém plameni, vznikají při jejím hoření iontové fragmenty a elektrony, které zvýší elektrickou vodivost plamene, a tím se zvýší i ionizační proud. Odezva detektoru je přímo úměrná koncentraci stanovované látky v nosném plynu. Výsledný grafický záznam závislosti napěťové odezvy detektoru na čase se nazývá chromatogram. Plocha či výška píku je úměrná množství stanovované látky, což umožňuje určit množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku. Jako všechny chromatografické metody je i plynová chromatografie srovnávací metodou, a proto je nutné provést měření s danými standardy za účelem získání kalibrační křivky, ze které se následně odečítá koncentrace stanovované látky ve vzorku.



**Obr 53: Schéma plynového chromatografu**

(zdroj: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>)

*Zdroj nosného plynu* - dusík

*Čistící zařízení* - zachycení vlhkosti a nečistoty v nosném plynu

*Regulační systém* - zajištění stálého nebo měnícího se průtoku nosného plynu kolonou a detektorem (průtok 1 ml/min)

*Dávkovač* - zavedení vzorku do proudu nosného plynu; nástřík se provádí pomocí injekční stříkačky přes septum, které odděluje vnitřek injektoru od vnějšího prostoru (1  $\mu$ l)

*Kolona* - kapilární kolona Quadrex Corporation 007 FFAP (Nitroterephthalic acid modified polyethylene glykol) – průměr: 0,25 mm, délka: 30 m, stacionární fáze ve formě tenkého filmu na vnitřní stěně kapiláry: 0,25  $\mu$ m; umístění stacionární fáze → separace složek vzorku

*Detektor* - plamenově ionizační detektor (FID); detekce látek v nosném plynu

*Termostat* - zajištění dostatečně vysoké teploty pro udržení vzorku v plynném stavu

*Vyhodnocovací zařízení* - zpracování signálu z detektoru → chromatografická křivka = chromatogram

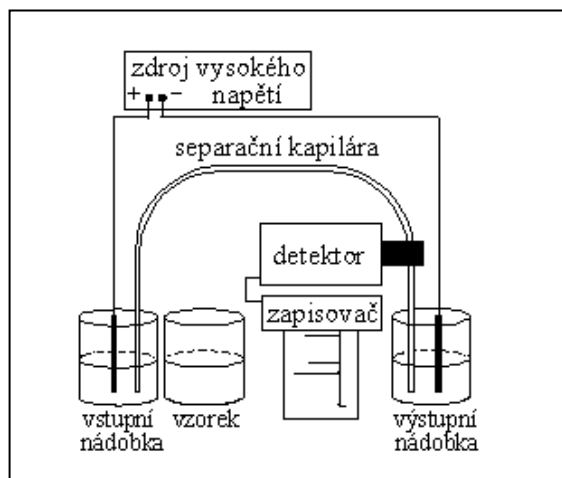


**Obr 54: Agilent 6820 Gas Chromatograph System, Agilent Technologies Inc.:** (1) regulační zařízení; (2) otočný karusel se vzorky; (3) injektor; (4) termostat s kolonou uvnitř; (5) detektor FID; (6) vyhodnocovací zařízení

Izotachofórze (ITP) je moderní analytická separační metoda. Patří mezi elektromigrační (elektroforetické) techniky - separace je založena na rozdílné pohyblivosti stejně nabitých iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. Separace ve volném roztoku se provádí v kapiláře. V ITP se používají dva základní elektrolyty - vedoucí a zakončující. Vedoucí elektrolyt obsahuje ion (kation/anion) s nejvyšší pohyblivostí z celé separované směsi a zakončující roztok obsahuje ion (kation/anion) s nižší pohyblivostí než kterýkoliv ze separovaných iontů. Vzorek směsi iontů se vkládá do rozhraní těchto elektrolytů (Obr 55). Při stejnosměrném elektrickém proudu migrují zóny v pořadí jejich pohyblivosti. Po úplné separaci všech složek se jednotlivé ionty pohybují v za sebou oddělených zónách v pořadí klesající pohyblivosti. Všechny zóny se pohybují stejnou rychlostí. Charakteristickou vlastností ITP je tzv. samozaostřující efekt.

V případě metody kapilární elektroforézy je příprava vzorku velmi jednoduchá. Dobře zcentrifugovaná bachorová tekutina se pouze naředí 200x destilovanou vodou. Takto upravený vzorek je již připraven k analýze. Dvoukapilárový analyzátor IONOSEP 2002 (Obr 56) má spojené dvě kapiláry nestejněho vnitřního průřezu (0,6 a 0,25 mm).

V silnější předseparační kapiláře je možné vyhodnotit makrosložky a v tenčí analytické kapiláře lze vyhodnotit složky minoritní. Nástřik vzorku (30  $\mu$ l) do rozhraní vedoucího a

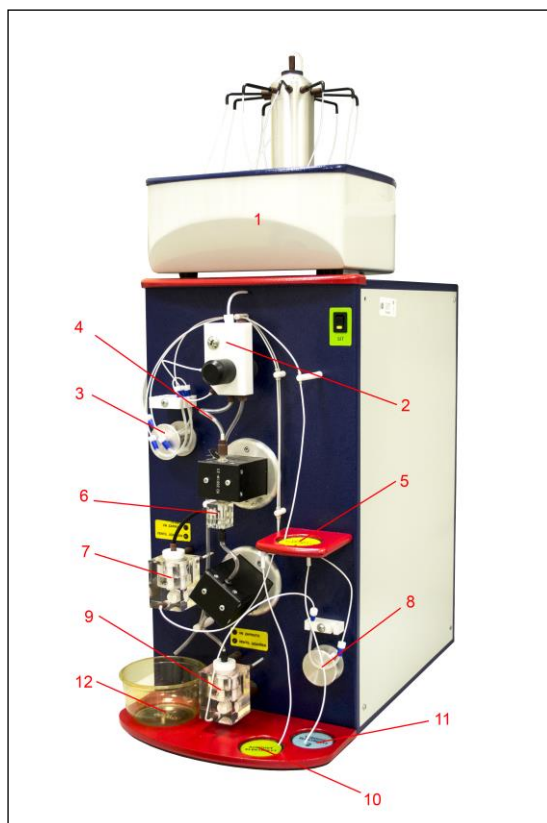


zakočujícího elektrolytu se provádí pomocí mikrostříkačky nebo dávkovacího ventilu. Jako vedoucí elektrolyt se používá směs 10 mM HCl, 22 mM kyseliny aminokapronové a 0,05 % hydroxyetylcelulozy (pH 4,55) a koncovým elektrolytem je 5 mM kyselina kapronová. Analyzátor pracuje v automatickém režimu (dávkování vzorků i elektrolytů) a je vybaven měničem na 10 vzorků.

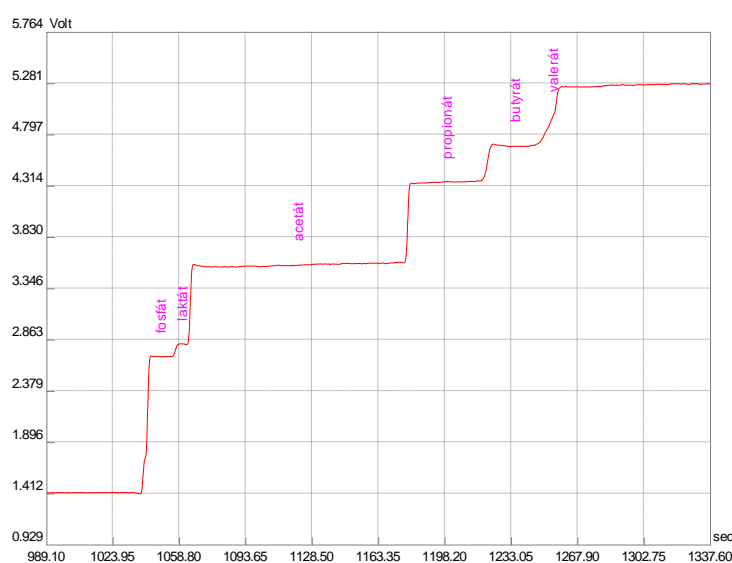
**Obr 55: Schéma kapilární izotachoforézy**

(zdroj: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>)

Detektor je umístěn na konci kapiláry. Analyzátor je vybaven třemi detektory - *dva bezkontaktní, vysokofrekvenční, vodivostní detektory a jeden UV-VIS detektor 200 - 600 nm*. Kvalitativní informaci v ITP poskytuje výška vlny (Obr 57) - nejčastěji vyjadřovaná jako poměrné číslo RSH (relative step height).



**Obr 56: Dvoukapilárový analyzátor IONOSEP 2002, Recman Laboratory Technology:** (1) automatický měnič vzorků, (2) rezervoár koncového elektrolytu s dávkovacím kohoutem, (3) peristaltické čerpadlo vzorku, vedoucího elektrolytu 1 a koncového elektrolytu, (4) předseparační (horní) kapilára, (5) zásobní nádobka vedoucího elektrolytu, (6) separační (dolní) kapilára, (7) rezervoár vedoucího elektrolytu 1, (8) peristaltické čerpadlo vedoucího elektrolytu 2, (9) rezervoár vedoucího elektrolytu 2, (10) zásobní nádobka koncového elektrolytu, (11) zásobní nádobka vedoucího elektrolytu 2, (12) odpad



**Obr 57: Výstup z ITP - stanovení parametrů BT**

### 4.3 Postanalytická fáze

Vyšetření bachorové tekutiny umožňuje diagnostikovat bachorové dysfunkce, pomáhá při vyšetření metabolismu dojnic a při hodnocení výživy. Poruchy bachorové fermentace souvisí s chybami ve skladbě krmné dávky (KD). V bachorové tekutině se stanovuje pH, celková koncentrace těkavých mastných kyselin ( TMK), koncentrace kyseliny octové, propionové, máselné, valerové, dále koncentrace kyseliny mléčné, amoniaku a počet nálevníků.

\*\* ↑ celková koncentrace TMK ... nadměrný přísun sacharidů v KD \*\*

\*\* ↓ celková koncentrace TMK ... nedostatek sacharidů v KD \*\*

\*\* ↑ koncentrace acetátu ... zvýšený příjem objemného krmiva  
nedostatek lehce fermentovatelných sacharidů v KD \*\*

\*\* ↑ koncentrace propionátu ... zvýšený přísun jaderného krmiva,  
nedostatek strukturální vlákniny \*\*

\*\* ↑ koncentrace butyrátu ... zkrmování nekvalitní zahliněné siláže \*\*

\*\* ↑ koncentrace laktátu ... zvýšený přísun jaderného krmiva \*\*

\*\* ↑ koncentrace amoniaku ... překrmování bílkovinami, nebílkovinnými dusíkatými látkami,  
intoxikace močovinou, nedostatek lehce degradovatelných sacharidů v KD \*\*

#### 4.3.1 Jednoduchá bachorová indigestie (*Indigestio simplex*)

Jednoduchá bachorová indigestie je charakterizována sníženou aktivitou mikrobiální činnosti a biochemizmu. Příčinou vzniku jednoduché bachorové indigestie je nevyrovnaná krmná dávka - například snížený obsah lehce stravitelných sacharidů, bílkovin, fosforu, kobaltu a zinku v krmné dávce, nebo krmná dávka s vysokým podílem balastních krmiv (slámy či podřadného sena s vysokým obsahem hrubé vlákniny).

Jednoduchá bachorová indigestie má zpravidla chronický průběh a stádový charakter. Je charakterizována sníženou užítkovostí, poruchami reprodukce, ztrátou lesku a vypadáváním srsti a lízavkou. Diagnostika jednoduché indigestie spočívá ve vyšetření bachorové tekutiny. pH bachorové tekutiny je při horní hranici normy, nebo mírně zvýšené. Koncentrace TMK je snižena, přičemž je snižena především koncentrace kyseliny propionové a naopak koncentrace kyseliny octové je relativně zvýšená. Počet nálevníků je snížen. Při déletrvající dysfunkci se rozvíjí anémie a hypoproteinemie.

**\*\* pH ... kolem 7 \*\***

**\*\* snížená acidita ... < 10 titračních jednotek \*\***

**\*\* snížená koncentrace celkového množství TMK ... < 80 mmol/l \*\***

**\*\* snížená koncentrace amoniaku ... < 6 mmol/l \*\***

**\*\* snížený počet nálevníků ... < 2 x 10<sup>5</sup>/ml \*\***

#### **4.3.2 Akutní acidóza bachorového obsahu (*Acidosis ingestorum ruminis acuta*)**

Akutní acidóza bachorového obsahu, známá také pod názvem laktacidóza, intoxikace kyselinou mléčnou či bachorová toxemie, vzniká při nadměrném příjmu krmiva s vysokým obsahem lehce fermentovatelných sacharidů. Nejčastěji to je vysoký podíl jadrných krmiv v KD, nebo zkrmování velkého množství cukrové řepy, brambor, melasy, mláta, vlhkého kukuřičného zrna. U malých přežvýkavců je častou příčinou onemocnění příjem padaného ovoce, nebo zkrmování zbytků potravin jako je vařená rýže či různé cukrářské výrobky. Po příjmu krmiv s vysokým obsahem sacharidů dochází v bachoru k intenzivní fermentaci a k tvorbě velkého množství TMK, což vede ke snížení pH bachorového obsahu, a toto prostředí se stává nepříznivým pro fyziologickou bachorovou mikroflóru. Rychle ubývá počet celulolytických bakterií a zvyšuje se zastoupení G+ bakterií - streptokoků a laktobacilů. Tyto bakterie tvoří kyselinu mléčnou, která se v bachorovém prostředí hromadí a velmi rychle snižuje pH až na hodnotu 4. V průběhu několika hodin se koncentrace kyseliny mléčné v bachorové tekutině zvýší z 1 až 2 mmol/l až na hodnotu kolem 80 mmol/l. V důsledku vysoké koncentrace kyseliny mléčné mizí v bachoru nálevníci, celulolytické bakterie i ostatní bakterie včetně streptokoků a laktobacilů. Kyselina mléčná má značnou osmotickou aktivitu, v důsledku čehož dochází k přestupu vody z vnitřního prostředí organismu do bachoru a vzniká dehydratace organismu a zvodnění bachorového obsahu. Kyselina mléčná dráždí sliznici bachoru a vyvolává zánět sliznic předžaludku i střev. Přestupuje do vnitřního prostředí a vyvolává metabolickou acidózu. Rychle se rozvíjí výrazný klinický syndrom charakterizovaný ulehnutím, vodnatým průjmem - někdy s příměsí krve, apatií, komatem, a pokud není včas zahájena správná terapie, dochází k exitu zvířete.

Pro diagnostiku je důležitá anamnéza, klinický obraz a vyšetření bachorové tekutiny.

Bachorová tekutina je vodnatá, šedobílé barvy a kyselého zápachu. Po zavedení bachorové sondy spontánně vytéká. pH bachorové tekutiny se pohybuje v rozmezí 4 až 5,5. Koncentrace kyseliny mléčné se pohybuje v rozmezí 30 až 80 mmol/l. Vyšetřením krve lze prokázat výraznou metabolickou acidózu s hodnotami BE -12 až -20 mmol/l. a další změny typické pro dehydrataci a poruchy jater a ledvin.

**\*\* šedo zelená až šedobílá barva \*\***

**\*\* výrazně kyselý zápach \*\***

**\*\* pokles pH ... < 5 \*\***

**\*\* zvýšená celková titrační acidita ... > 30 titračních jednotek \*\***

**\*\* snížená produkce TMK ... 30 - 50 mmol/l \*\***

**\*\* zvýšená produkce kyseliny mléčné \*\***

**\*\* vymizení nálevníků ... při pH < 5,5 \*\***

**\*\* úplná defaunace při rozvinuté akutní acidóze \*\***

### **4.3.3 Subakutní acidóza bachorového obsahu (SARA)**

Subakutní bachorová acidóza je porucha trávení v předžaludku, při které je pH bachorové tekutiny snižené pod hodnotu 5,6 déle než 3 hodiny denně. Tento typ bachorové indigestce je v chovech dojnic nejčastější. Má chronický charakter a postihuje velký počet zvířat v chovu. Tento stav je zapříčiněn nevyváženou krmnou dávkou s nedostatkem efektivní vlákniny a vysokým obsahem energie. Nedostatek efektivní vlákniny a nevhodná struktura KD omezuje přežvykování a produkci slin. Bachorový obsah není dostatečně pufrován, a proto dochází k acidóze. Značnou roli na vzniku subakutní bachorové acidózy hraje zpomalená resorpce TMK v důsledku nedostatečné adaptace bachorové sliznice na počátku laktace. Malá resorpční plocha bachorové sliznice neumožňuje rychlé vstřebávání TMK do krve a TMK se hromadí v bachoru a vyvolávají pokles pH. V důsledku toho klesá pH, mění se složení bachorové mikroflóry a poměr těkavých mastných kyselin. Narušení fyziologických poměrů TMK způsobuje lokální změny na bachorové sliznici, změny bachorové tekutiny a závažné systémové poruchy. V důsledku snížené tvorby kyseliny octové dochází k poklesu koncentrace tuku v mléce. V důsledku acidózy dochází k laminitidám a zvýšenému kulhání dojnic. Později se vyskytují poruchy reprodukce. (ovariální cysty, embryonální mortalita). Výkaly mají řídkou konzistenci, světlou barvu a obsahují nestrávené zbytky vlákniny. pH výkalů je snižené.

Pro diagnostiku je důležitá anamnéza, informace o tučnosti mléka, výskyt kulhání a reprodukčních problémů a vyšetření bachorové tekutiny. V bachorové tekutině je snižená koncentrace kyseliny octové a zvýšená koncentrace kyseliny propionové. pH bachorové tekutiny je na spodní hranici referenčních hodnot, nebo snižené. Rozhodující význam pro konečné stanovení diagnózy má vyšetření bachorové tekutiny, při němž můžeme zjistit typické změny pro subakutní bachorovou acidózu.



**\*\* světlehnědá nebo světlešedá barva \*\***

**\*\* aromatický zápach \*\***

**\*\* pH ... 5 - 6 \*\***

**\*\* celková acidita ... > 30 titračních jednotek**

**\*\* snížený počet nálevník**

**\*\* změny v poměru TMK**

#### **4.3.4 Alkalóza bachorového obsahu (*Alcalosis ingestorum ruminis*)**

Alkalóza bachorového obsahu je charakterizována zvýšením pH bachorové tekutiny a změnami v zastoupení jednotlivých TMK. Vzniká v důsledku zvýšeného příjmu dusíkatých látek za nedostatečného obsahu sacharidů v KD a dále při zkrmování balastní KD, kdy krávy delší dobu přežvykují a produkují tak vyšší množství slin. Alkalóza může probíhat akutně nebo chronicky. Nejčastější příčinou alkalózy bachorového obsahu je nevyrovnanost krmné dávky se zúženým poměrem živin, s vysokým podílem dusíkatých látek v proteinové nebo syntetické formě (močovina) a při současném nedostatku snadno degradovatelných sacharidů. K akutní bachorové alkalóze dochází rovněž při otravách močovinou. V důsledku inaktivity mikroflóry bachoru dochází k depresi tvorby TMK, především kyseliny propionové, a zvýšení pH bachorové tekutiny. Alkalické prostředí umožňuje množení nežádoucích mikroorganismů rodu *Coli*, *Proteus* a produkci toxických látek v bachoru. Amoniak je z bachoru resorbován do krve a po překročení ureosyntetické schopnosti jater vyvolává hyperazotemii a nepříznivě ovlivňuje centrální nervovou soustavu (CNS).

Zpočátku se onemocnění projevuje inapetencí, omezenou motorickou činností bachoru a zpomaleným přežvykáním. Později se vyskytuje neklid, předráždění, třes svalstva až tonicko-klonické křeče. Již při mírné formě onemocnění dochází k poklesu produkce mléka, zvyšuje se počet somatických buněk v mléce a koncentrace močoviny. Je patrný zvýšený výskyt mastitid. Pro diagnostiku je důležité vyšetření bachorové tekutiny - smyslové vyšetření, stanovení pH, amoniaku a obsahu celkových i jednotlivých TMK.

\*\* tmavší hnědozelená barva \*\*  
 \*\* amoniakální zápach \*\*  
 \*\* pH ... > 7,4 \*\*  
 \*\* snížená tvorba TMK ... 20 - 60 mmol/l \*\*  
 \*\* zvýšená produkce amoniaku \*\*  
 \*\* redukce počtu nálevníků \*\*  
 \*\* poměr TMK ... kys. octová (60 - 80 %), kys. máselná (15 - 22 %),  
 kys. propionová (8 - 10 %) \*\*  
 \*\* zpomalená sedimentace a flotace \*\*

#### 4.3.5 Hniloba bachorového obsahu (*Putrefactio ingestorum ruminis*)

Hniloba bachorového obsahu je charakterizována hnilobným rozkladem bachorové zažitiny, výrazně alkalickým pH a změnami v zastoupení jednotlivých TMK. Vzniká při krmení zvířat narušenými krmivými hnilobným procesem, nebo se může vyvinout z alkalózy bachorového obsahu. Při posunu pH do alkalické oblasti dochází k pomnožení mikroorganismů *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, které způsobí hnilobný rozklad bachorového obsahu a tvorbu toxických produktů. Klinické příznaky hniloby bachorového obsahu spočívají v nechutenství, výrazném poklesu užitkovosti, zvýšeném počtu somatických buněk v mléce a ve zvýšeném výskytu mastitid a laminitid. Výkaly jsou průjmovité, tmavé barvy a typicky zapáchají. Později dochází k ulehnutí, výskytu křečí, dále k apatii, komatóznímu stavu a exitu. Pro diagnostiku je důležité vyšetření bachorové tekutiny. Typickým nálezem je vysoké pH, hnilobný zápach bachorové tekutiny, snížená koncentrace TMK, nízká koncentrace kyseliny propionové a vysoká koncentrace kyseliny máselné.

\*\* tmavší barva \*\*  
 \*\* vodnatá konzistence, často s obsahem pěny \*\*  
 \*\* hnilobný až močůvkovitý zápach \*\*  
 \*\* v pozdějších stádiích ... zahuštění bachorového obsahu \*\*  
 \*\* sedimentační a flotační čas se prodlužuje, flotovaných částic je málo nebo chybí \*\*  
 \*\* pH ... 7,5 - 8,5 \*\*  
 \*\* ↓ koncentrace celkových TMK ... 20 - 40 mmol/l \*\*  
 \*\* ↑ poměr kyseliny máselné ... 20 - 36 % \*\*  
 \*\* ↑ koncentrace amoniaku \*\*  
 \*\* infuzoria (nálevníci) z bachorového prostředí mizí \*\*

**Tab 4: Přehled hodnot chemických parametrů bachorové tekutiny při daných dysfunkcích bachoru**

Dysfunkce	Jednoduchá bachorová indigescce	Akutní acidóza	Chronická acidóza	Norma	Alkalóza	Hniloba
Barva	hnědozelená	mléčně šedá	šedozeleá	olivově zelená	hnědozelená	hnědozelená až černá
Zápach	méně aromatický	kyselý	kyselý	typicky aromatický	amoniakální	hnilobný
Konzistence	vodnatá	vazká vodnatá	vodnatá	slabě viskózní	variabilní	kašovitě zpěněná
Sedimentace	zrychlená	rychlá, pak bez sedimentu	zrychlená	3 – 11 min.	zpomalená	bez sedimentace
Flotace	-	-	slabá nebo -	do 10 min. po odběru	variabilní	-
pH	6,8 – 7,2	3,8 – 4,5	5,0 – 6,0	6,2 – 6,8	7,2 – 8,0	7,5 – 8,5
Acidita				10 - 25 titr. jedn.		
Amoniak	↓	↓	↓	5 - 10 mmol/l	↑	↑
Počet nálevníků	40 – 100	0	0 – 150	200 – 400 tisíc/ml	50 – 150	0 – 50
Celkové TMK	↓	↓↓	↑	80 – 120 mmol/l	↓	↓↓
Kys. octová	=	↓	↓	55 – 65 mol. %	=↓	↓
Kys. propionová	=↓	↑	↑	15 – 25 mol. %	↓	↓
Kys. máselná	-	↑	↑	Do 10 – 15 mol. %	↑	↑
Kys. mléčná	↓	↑↑	↑	0,0 – 3,0	stopy	stopy

**Tab 5: Přehled hodnot chemických parametrů bachorové tekutiny u velkých zvířat**

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA
pH		6,2 – 6,8	6,3 – 7,1	6,2 – 7,0
NH <sub>3</sub>	mmol/l	5,8 – 17,8	4,0 – 18,0	2,5 – 19,0
Nálevníci	tis/l	200 – 410	200 – 650	200 – 800
Kyselina mléčná	mmol/l	0,00 – 3,30	0,00 – 1,00	0,02 – 1,00
TMK	mmol/l	80 – 120	80 – 130	80 – 140
Kyselina octová	%	55 – 75	60 – 75	55 – 75
Kyselina propionová	%	15 – 25	15 – 25	15 – 28
Kyselina máselná	%	10 – 17	9 - 18	7 – 16

## **5 Biochemické vyšetření**

Vzorky určené k biochemickému vyšetření se vyšetřují od individuálního pacienta nebo z hromadných odběrů, které vytváří obraz zdravotního stavu stáda. Nejčastějšími typy vzorků v rámci biochemického vyšetření jsou plná krev, krevní plazma nebo sérum a moč. Stanovení daných parametrů ve vyšetřovaných vzorcích se provádí v rámci všeobecného a předoperačního vyšetření, dále z důvodu různých příznaků, mezi které patří nechutenství, zvracení, průjem, slabost, poruchy růstu a vývoje, ulehnutí a jiné. U skotu je vyšetření velmi často prováděno při poruchách energetického a dusíkového metabolismu.

Výběr parametrů pro biochemické vyšetření se provádí na základě anamnézy, klinického vyšetření a dalších projevů poruch zdraví jednotlivých zvířat a celého stáda. Parametry lze obecně rozdělit na substráty, metabolity, enzymy, makroprvky, mikroprvky, hormony a vitamíny.

V rámci biochemického vyšetření jsou u skotu prováděny metabolické profilové testy. Dělí se na preventivní metabolické testy (používané při kontrole výživy) a diagnostické metabolické testy (používané při výskytu poruch produkce, reprodukce nebo zdravotních poruch - tedy nejčastěji při poklesu užitkovosti, při změnách ve složení mléka, zhoršení reprodukčních funkcí ve stádě a v neposlední řadě také při zvýšeném výskytu zdravotních poruch).

### **5.1 Preanalytická fáze**

Stanovení většiny biochemických parametrů lze provádět ze séra i plazmy. Mezi výjimky patří parametry jako albumin, nenasycené mastné kyseliny (NEMK) a hormony ( $T_3$ ,  $T_4$ , kortizol), které lze stanovit pouze ze séra. Koncentrace glukózy se přednostně stanovuje z plazmy z důvodu probíhající glykolýzy při delším srážení krve, která vede k výraznému snížení její koncentrace. Stanovení aktivity enzymů superoxid dismutázy (SOD) a glutation peroxidázy (GPX) se provádí z plné krve.

#### **5.1.1 Odběr vzorku**

Krev se na biochemické vyšetření odebírá za použití odběrky Hemos nebo speciálních zkumavek (Obr 59, Obr 60). Místa odběru u jednotlivých druhů zvířat jsou uvedena v Tab 1.



**Obr 58: Odběr krve u berana (vlevo) a krávy (vpravo)**

#### 5.1.1.1 Sérum

Krev se odebírá do hemosek bez antikoagulačního činidla (Obr 58) nebo do zkumavek s urychlovačem srážení.

Po odběru dochází k pozvolnému srážení krve, které probíhá

v rozmezí 12 - 24 hod. Tento proces lze urychlit zvýšením teploty – srážení krve v termostatu při 37 °C.

Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobující hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- uchování vzorku při pokojové teplotě (18 - 25 °C)
  - nedodržení teploty → špatné srážení vzorku/hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny

Po sražení vzorku se sérum získá následnou centrifugací po dobu 10 min při zrychlení 3000 ot/min. Sérum lze použít přímo ke stanovení, případně uchovat v lednici nebo pro pozdější užití lze zamrazit.



**Obr 59: Různé typy odběrky Hemos**



**Obr 60: Zkumky s urychlovačem srážení**

#### 5.1.1.2 Plná krev a plazma

Při vyšetření parametrů z plné krve a plazmy je nutno k odebranému vzorku přidat protisrážlivé činidlo. Jako antikoagulant se nejčastěji používá heparin. K odběru slouží

komerčně vyrobené zkumavky již s heparinem nebo čisté hemosky či zkumavky s přidanými 2 - 3 kapkami heparinu. Pro stanovení koncentrace glukózy se krev odebírá do zkumavky s fluoridem sodným, který zabraňuje srážení krve i glykolýze. Krev na vyšetření ABR se musí odebírat anaerobně do injekční stříkačky s přídavkem heparinu. Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobující hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- promíchání krve ihned po odběru
  - pokud nedojde k promíchání antikoagulantu s krví, vzorek se srazí → vzorek nelze použít
- uchování vzorku v chladu - lednice (4 °C)

Plnou krev lze použít přímo ke stanovení daných parametrů. Plazma se získá centrifugací vzorku (10 min, 3000 ot/min). Vzorky se uchovávají v lednici nebo pro pozdější užití je lze zamrazit.

## 5.2 Analytická fáze

### 5.2.1 Fotometrická stanovení biochemických parametrů

Stanovení většiny biochemických parametrů se provádí na **automatickém biochemickém analyzátoru Lysis (AMS - Analyzer Medical System)**. Přehled stanovovaných parametrů a jejich referenčních hodnot je uveden v Tab 9. Analytická měření v analyzátoru probíhají **na**



**principu fotometrie**. Fotometrická stanovení se řadí mezi optické spektrální absorpční metody, které sledují absorpci záření vzorkem. Je při nich využíváno vlnových délek z různých oblastí spektra elektromagnetického záření. Tak jako jednoduché spektrometry obsahuje i analyzátor tyto základní části:

**Obr 61: Obsluha biochemického analyzátoru Lysis**

- zdroj záření - halogenová žárovka
- monochromátor - 8 interferenčních filtrů (340, 380, 405, 492, 510, 546, 578, 620 nm)
- zařízení pro vzorek - 60 plastických kyvet

- detektor elektromagnetického záření
- výstupní zařízení - samostatný PC s přehledným uživatelským softwarem pro ovládání a komunikaci s analyzátozem a kontrolu grafických a statistických výstupů.

\*\* zdroj záření → monochromátor → kyveta se vzorkem → detektor → zpracování a zobrazení signálu \*\*

Reagencie pro stanovení jednotlivých parametrů i vzorky séra ve zkumavkách eppendorf jsou v tzv. racku (stojanu) vkládány do přístroje (Obr 61). Pro reagencie i vzorky je vyčleněn daný prostor a speciální stojany pro jejich vložení do přístroje (Obr 62). Při měření jsou vzorky i reagencie pipetovány do reakčních kyvet, kde dochází k reakci, inkubaci i detekci záření při



dané vlnové délce. Jehla na dávkovacím rameni obsahuje čidlo ve funkci hladinového senzoru - minimální reakční objem vzorku je 300  $\mu$ l.

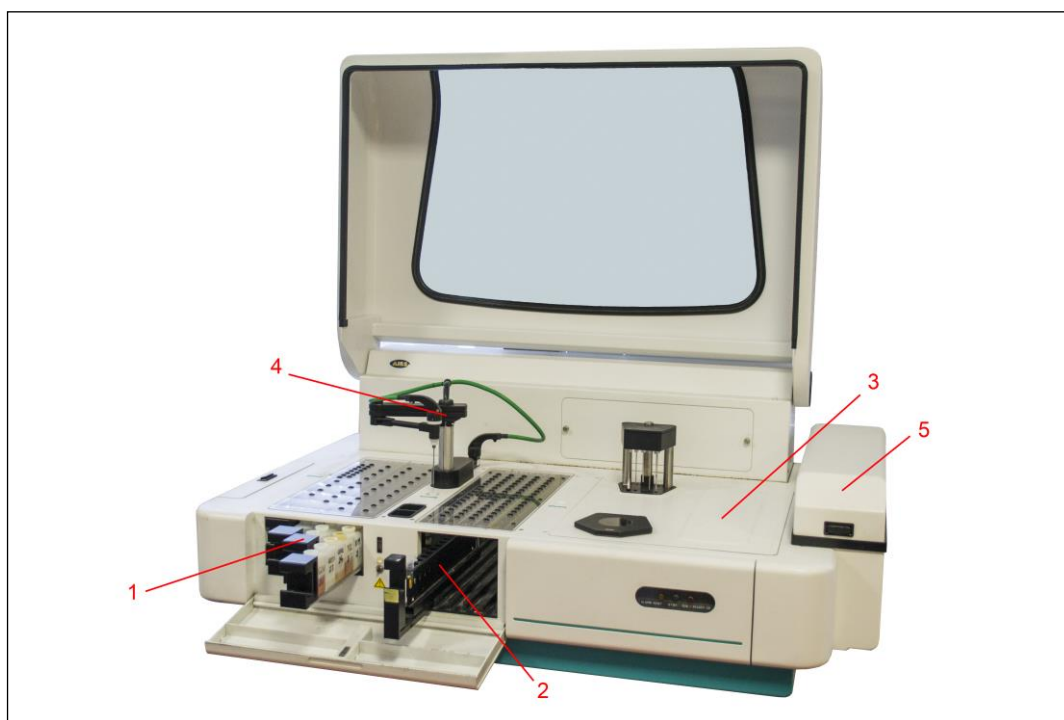
**Obr 62: Racky s reagensiemi a vzorky séra**

Kyvety jsou temperovány na teplotu 37 °C a promývány v mycí lince kyvet. Stanovení daného biochemického parametru je charakterizováno typem reakce (kinetika/end-point), objemem vzorku a reagensie, množstvím reagensií (jedno-reagenční/dvou-reagenční), dobou inkubace a vlnovou délkou, při které dochází k měření absorbovaného záření.

\*\* vzorek + reagensie → reakce + inkubace v reakční kyvetě → detekce absorbovaného záření \*\*

Analytický modul je členěn na jednotlivé prostory (Obr 63).





**Obr 63: Automatický biochemický analyzátor Lyasis, AMS - Analyzer Medical System: (1) prostor pro reagensie, kalibrátory a kontroly; (2) prostor pro vzorky; (3) kruhový prostor pro reakční kyvety doplněný vlastní fotometrickou jednotkou a mycí linkou kyvet; (4) dávkovací rameno s jehlou; (5) prostor pro nádoby s mycími roztoky a destilovanou vodou - promývací roztoky: Rinse Solution (AMS) a Cleaning Solution (AMS)**

Kalibrace přístroje se provádí současně pro jednotlivé zavedené metody pomocí kalibrátoru - standardu (Diacal Auto - Dialab) a kontroly (Diacon N - Dialab). Mezi výjimky, které se kalibrují za použití speciálního standardu a kontroly, patří BHB -  $\beta$ -hydroxybutyrát (Ranbut standard - RANDOX; Assayed Human Multi Sera - RANDOX ) a GPX - glutation peroxidáza (Ransel Standard - RANDOX; Ransel Control – RANDOX). Biochemické parametry se stanovují za použití komerčních kitů od firem Erba Lachema, BioVendor, Dialab a Randox.

Stanovení koncentrace neesterifikované mastných kyselin (NEMK), celkové antioxidační kapacity (TAS) a aktivity superoxid dismutázy (SOD) se provádí na **biochemickém analyzátoru Cobas Mira Plus**. Příklad funguje na stejném principu jako analyzátor Lyasis - **fotometrie**, kde:

- zdroj záření - xenonová výbojka
- výběr vlnové délky - 5 interferenčních filtrů (340, 405, 500, 550, 600 nm)
- zařízení pro vzorek - 6 jednorázových plastických segmentů po 12-ti kyvetách
- detektor elektromagnetického záření

- výstupní zařízení - centrální kontrolní panel pro ovládání a komunikaci s analyzátořem a kontrolu získaných výsledků.

Analytický modul je členěn na jednotlivé prostory (viz Obr 64).

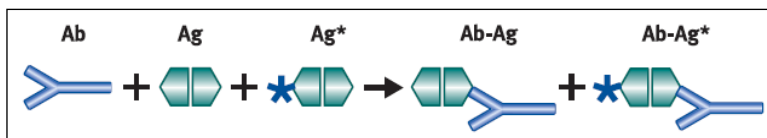


**Obr 64: Biochemický analyzátoř Cobas Mira Plus, Roche:** (1) prostor pro reagentie, vzorky, kalibrátory, kontroly a mycí roztok - promývací roztok: Mucasol (Merz); (2) kruhový prostor pro reakční kvety doplněný vlastní fotometrickou jednotkou (teplota v kvetách je udržována na 37 °C); (3) dávkovací rameno s jehlou - jehla obsahuje čidlo ve funkci hladinového senzoru (minimální reakční objem 100 µl); (4) nádoba s destilovanou vodou a odpad

Přístroj je kalibrován za použití daných standardů a kontrol od Firmy Randox (NEMK - NEFA Standard, Assayed Human Multi Sera; TAS - TAS Standard, TAS Control; SOD - Ransod Standard. Stanovení daných parametrů (NEMK, TAS, SOD) je prováděno za použití komerčních kitů také od firmy Randox.

### 5.2.2 Chemiluminiscenční imunometrická analýza hormonů

**IMMULTE - IMMUNOASSAY ANALYZER** je analyzátoř pro automatizovanou imunoanalýzu určený k provádění chemiluminiscenčních imunometrických analýz. Stanovení je založeno na rovnovážné **kompetitivní reakci následované chemiluminiscenční detekcí**. Principem kompetitivní imunoreakce je soutěžení o vazebná místa protilátek mezi neznačeným analytem v testovaném vzorku a přidaným značeným analytem (Obr 65). Neznačený antigen (Ag) blokuje vazbu značeného antigenu (Ag\*). Naměřený signál je tedy



nepřímo úměrný koncentraci analytu (čím menší signál, tím vyšší koncentrace).

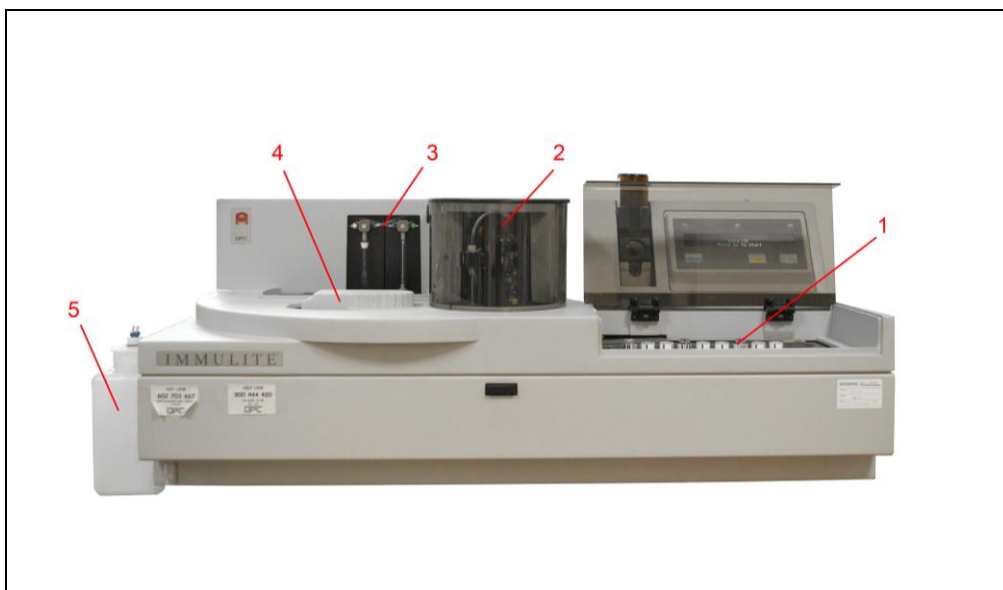
**Obr 65: Princip kompetitivní imunoreakce**

(zdroj: [http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf))

Chemiluminiscenční spektrometrie se řadí do okruhu luminiscenční spektrometrie.

Chemiluminiscence nastává, produkuje-li chemická reakce elektronově excitované látky, které emitují fotony, aby dosáhly základního stavu.

Analytický modul je členěn na jednotlivé prostory (viz Obr 66).



**Obr 66: IMMULITE – IMMUNOASSAY ANALYZER, Siemens:** (1) prostor pro reakční kyvetky, vzorky a kalibrátory - dávkovací plošina; (2) pipetor ; (3) mycí stanice dávkovací sondy; (4) karusel se značenými činidly; (5) prostor pro mycí roztok a destilovanou vodu - promývací roztok: Probe Wash module (Siemens)

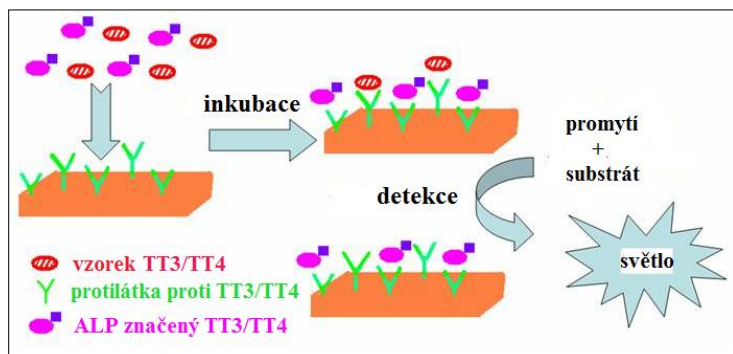
Systém IMMULITE používá jako pevnou fázi plastickou kuličku potaženou specifickou protilátkou pro daný analyt ve speciálně tvarované reakční kyvetě (Obr 67).

Reakční kyveta slouží jako reakční nádobka pro imunoreakci, inkubaci, promývání a vývin signálu. Chemiluminiscenční substrát reaguje s enzymovým konjugátem vázaným na kuličce.



**Obr 67: Reakční kyvetky a vzorky pro stanovení TT3 a TT4**

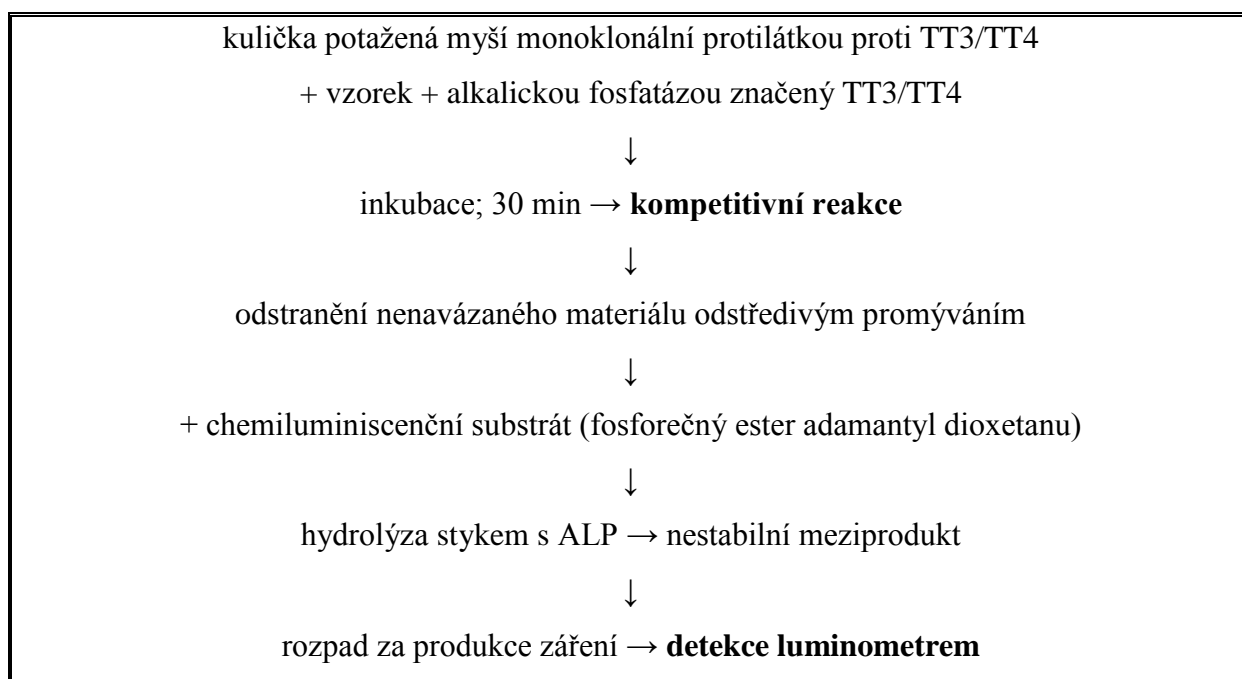
Vznikající emitované světlo je detekováno fotonásobičem (Obr 68). Impulzy za sekundu jsou převedeny na koncentrace s využitím kalibrační křivky, stanovené výrobcem. Křivka je



pravidelně adjustována dvěma kalibrátory (součást komerčního kitu), které jsou vloženy a zpracovány stejným způsobem jako biologické vzorky.

**Obr 68: Schéma imunochemického stanovení koncentrace TT3 a TT4**

Této metody se využívá ke stanovení **koncentrace celkového trijodtyronin (TT3) a celkového tyroxinu (TT4)** v séru. K jednomu stanovení je třeba 25  $\mu$ l (TT3)/15  $\mu$ l (TT4) vzorku a dalších 100  $\mu$ l jako mrtvý objem mikrozkušavky. K měření je využíváno komerčních kitů TT3 a TT4 od firmy Siemens.



### 5.2.3 Vyšetření acidobazické rovnováhy

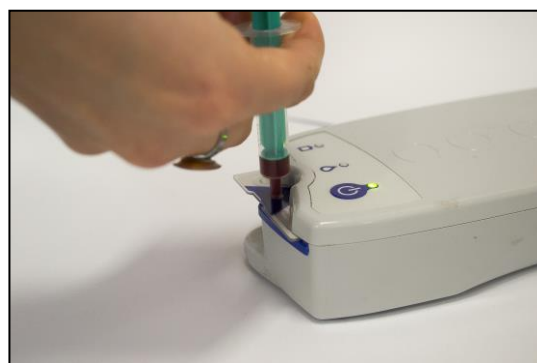
Zjištění acidobazického stavu krve je důležitým ukazatelem funkčního stavu organismu, a proto je považováno za významnou diagnostickou metodu. Vyšetření acidobazické rovnováhy (ABR) je určeno poměrem kyselin a bází v krvi resp. organismu. Rovnováha mezi kyselými a zásaditými látkami v organismu je udržována pomocí pufrů - nárazníků a regulace respirace a metabolických pochodů. Mezi měřené parametry sloužící ke stanovení ABR patří pH krve,



parciální tlak  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), parciální tlak  $\text{O}_2$  ( $\text{pO}_2$ ), koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  a přebytek bází (base excess - BE). Vyšetření ABR se provádí pomocí přístroje epic Blood Analysis System. Analyzátor je založen na principu elektronických karet – epic BGEM Test Card (Obr 69), které umožňují stanovení daných parametrů z arteriální, venózní či kapilární plné krve pacienta do 30 sekund od aplikace vzorku (Obr 70). Požadované množství vzorku krve pro měření je cca 92  $\mu\text{l}$ .

**Obr 69: Epic Blood Analysis System**

Výhodou analyzátoru je jeho použití v terénu, což eliminuje problémy s časným stanovením ABR po odběru vzorku krve. Kromě parametrů důležitých pro zjištění acidobazického stavu lze v daném vzorku krve současně stanovit koncentraci sodíku, draslíku, chloridů, ionizovaného vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ), glukózy, laktátu, kreatininu, hemoglobinu a procentuální zastoupení hematokritu.



**Obr 70: Aplikace vzorku při stanovení ABR**

### 5.3 Postanalytická fáze

Při řešení zdravotní problematiky v chovech skotu má laboratorní diagnostika velký význam. Je však vyšetřením doplňujícím. Základem diagnostiky je anamnéza, která zahrnuje i produkční a zdravotní analýzu, skupinové klinické vyšetření, individuální klinické vyšetření a výběr zvířat reprezentantů stáda pro odběr biologického materiálu (krev, moč, bachorová tekutina, mlezivo, mléko, výkaly, tkáně). Na základě zjištěných informací lze rozhodnout o rozsahu klinicko-biologického vyšetření, ve kterém nesmí být opomenut žádný důležitý parametr vyšetření, který by mohl objasnit problémy v chovu. Pro některá onemocnění jsou známy patognomické analyty pomáhající s diagnostikou. Patognomické analyty pro lipomobilizaci jsou koncentrace NEMK, BHB a aktivita AST. Pro ketózu je to koncentrace BHB v krvi a mléku, dále přítomnost ketolátek v moči, aktivita AST a koncentrace bilirubinu v krevním seru. Pro porodní parézu je patognomickým analytem koncentrace celkového a ionizovaného vápníku, pro hypofosforemické ulehnutí koncentrace fosforu a pro

hypomagnezemické tetanie pak koncentrace Mg v krevním séru. Pro diagnostiku karencí stopových prvků a vitamínů je patognomické snížení koncentrace těchto analytů v krevním séru nebo krvi a v jaterní tkáni, dále pak aktivita některých enzymů- např. GPX při karenci selenu. Při nefritidách se stanovuje koncentrace močoviny a kreatininu v krevním séru. U telat ve věku dvou až sedmi dnů je důležité posoudit stav kolostrální imunity a různé kareňní stavy. Stanovuje se CB, IgG, GMT, vitamín E (GPX, Cu, Zn a Fe). Vyšetření u jalovic se nejčastěji provádí ve věku šesti až osmi měsíců a poté ve věku dvanácti až patnácti měsíců a to za účelem posouzení vývoje jalovic a při diagnostice příčin infertility. Mezi stanovované parametry patří CB, albumin, močovina, glukóza, AST, CK, GPX, Ca, P, Mg, Cu a Mn. Mezi nejčastější biochemické parametry stanovované v krvi dojníc patří CB, albumin, močovina, kreatinin, bilirubin, AST, GMT, Ca, P, Se, Mn, NEMK, BHB, vitamíny A a E a β-karoten.

Při vyhodnocování výsledků laboratorního vyšetření se stanovuje nejen diagnóza u jednotlivě vybraných zvířat, ale také se hodnotí výsledky jednotlivých skupin a celého chovu. Vlastní vyhodnocení výsledků vyšetření metabolismu vyžaduje znalost referenčních hodnot a správnou interpretaci výsledků analýz.

### **5.3.1 Energetický profil**

Základem energetického metabolismu skotu je metabolismus sacharidů a lipidů. Hlavním energetickým zdrojem u přežvýkavců jsou těkavé mastné kyseliny tvořící se mikrobiální činností v batoru ze sacharidů krmné dávky. Zatímco nejdůležitějšími ukazateli sacharidového metabolismu u skotu jsou koncentrace glukózy a ketolátek v krvi, příp. koncentrace ketolátek v moči a mléce, v rámci lipidového metabolismu se analyzuje koncentrace NEMK, triacylglycerolů a cholesterolu.

**Glukóza** se tvoří v játrech z kyseliny propionové a dále z kyseliny mléčné, glykogenu, glycerolu a glukoplastických aminokyselin. Koncentrace glukózy klesá při nedostatku pohotové energie v KD, při nedostatku energie vzhledem k dusíkatým látkám KD, při nízké tvorbě kyseliny propionové v batoru, při ketózách a při těžkém narušení funkce jater. Nárůst koncentrace glukózy lze pozorovat v ojedinělých případech a to při stresu zvířat nebo v souvislosti s aplikací některých léků.

**Ketolátky** vznikají při mobilizaci NEMK v játrech nebo tvorbou z kyseliny máselné a kyseliny octové ve stěně předžaludku. Zvýšená koncentrace ketolátek má diagnostický význam při primární i sekundární ketóze, které vznikají při energetickém deficitu organismu, při katabolických procesech v organismu, různých typech hepatopatií, zkrmování siláží se

zvýšeným obsahem kyseliny máselné nebo krmných dávek s vysokým obsahem tuku. Naopak snížená koncentrace ketolátek v krvi nemá diagnostický význam. Koncentrace ketolátek je významnějším a citlivějším indikátorem energetické bilance než koncentrace glukózy. Koncentrace ketolátek nebývá zvýšená pouze v krvi, ale rovněž je vyšší množství ketolátek vylučováno močí (ketonurie) a mlékem (ketolakcie).

**Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK)** jsou považovány za významný indikátor lipomobilizace u vysokoprodukčních krav, která nastává v období negativní energetické bilance kvůli nedostatku energie. Koncentrace NEMK se v tomto období zvyšuje, což značí lipolýzu a hubnutí krav. Dalším důvodem zvýšené koncentrace NEMK je narušení jejich utilizace, naopak snížení jejich koncentrace není diagnosticky významné.

Koncentrace **triacylglycerolů** v krevním séru je velmi variabilní a je ovlivněna obsahem tuků v krmné dávce a funkčním stavem jater. Snížené hodnoty triacylglycerolů se vyskytují při narušené funkci jater, především v průběhu jaterní steatózy a u zvířat se špatným výživným stavem. Zvýšená koncentrace triacylglycerolů je patognomickým ukazatelem lipomobilizačního syndromu krav nebo zvýšeného příjmu energie, zejména tuků.

**Cholesterol** se v játrech krav syntetizuje z acetátu a slouží jako substrát pro tvorbu steroidních hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin. Jeho koncentrace v krvi se zvyšuje při zvýšení nabídky acetátu jako základního substrátu pro jeho tvorbu nebo při vyšším příjmu tuků v krmivu. Snížení koncentrace cholesterolu v krvi nastává při jaterní insuficienci a lipomobilizačním syndromu krav.

### 5.3.2 Dusíkový a bílkovinný profil

Studium dusíkatého metabolismu se zaměřuje především na metabolismus aminokyselin, detoxikaci amoniaku spojenou s tvorbou močoviny (ureosyntézou) a proteosyntézu. Metabolismus dusíkatých látek úzce souvisí s metabolismem energetickým, acidobazickým, jaterním a bacherovým.

Koncentrace **celkové bílkoviny (CB)** stoupá u starších zvířat, při dehydrataci organismu a při chronických zánětlivých procesech, kdy se zvyšuje tvorba globulinové frakce a posunuje se albumino-globulinový kvocient. Pokles koncentrace CB v krvi nastává při dlouhodobém hladovění zvířat, z důvodu nedostatku energie i dusíku využitelného pro proteosyntézu, při nedostatečné syntéze mikrobiálního proteinu v bacheru, déletrvajících bacherových dysfunkcích, těžkém narušení funkce jater (snížení syntézy albuminů), degenerativních a

zánětlivých změnách ledvin (ztráta albuminu močí), endoparazitózách a enteritidách. Koncentrace celkové bílkoviny je vyšší v krevní plazmě než v séru (část je zachycena v koagulu), což nesmí být opomíjeno při interpretaci výsledků.

**Močovina (urea)** je konečný produkt degradace bílkovin. Je syntetizována v játrech a vylučována ledvinami a mlékem. Obsah močoviny v krevní plazmě informuje o příjmu a metabolismu dusíku, dále o exkreční schopnosti ledvin a syntetické schopnosti jater. K nárůstu její koncentrace v krvi dochází při dysbalanci ve složení KD (nedostatek energie a lehce stravitelných sacharidů, přebytek dusíkatých látek, otrava močovinou) nebo při narušení zdravotního stavu (poruchy exkreční funkce ledvin, ruptura nebo ucpání močových cest, dehydratace organismu, katabolismus svalové tkáně, ketózy). Pokles její koncentrace nastává při dysbalanci ve složení krmné dávky (nedostatek dusíkatých látek v KD) nebo při zhoršení zdravotního stavu (závažné narušení funkce jater).

### 5.3.3 Enzymový a hepatální profil

Sérové enzymy se využívají zejména v diagnostice hepatopatií, myopatií a osteopatií. V krevní plazmě, krevním séru nebo tkáních se stanovuje aktivita těchto enzymů, která je fyziologicky nízká a zvyšuje se až změnou permeability buněčných membrán při narušení orgánů nebo po rozpadu buněk postiženého orgánu, kdy dochází k vyplavení intracelulárních enzymů do krve.

**Aspartátaminotransferáza (AST)** je intracelulární enzym lokalizovaný v cytoplazmě i v mitochondriích v játrech, srdci, kosterních svalech a ve sliznici střeva. Jeho aktivita stoupá při akutních poruchách jater, srdce a kosterních svalů.

**Alaninaminotransferáza (ALT)** je intracelulární enzym lokalizovaný v cytoplazmě i v mitochondriích jater, ledvin, srdce a kosterního svalstva. U skotu ALT není významným parametrem při diagnostice hepatopatií.

**Gamaglutamyltransferáza (GMT)** je enzym vázaný na membráně s vysokou aktivitou v játrech, pankreatu, ledvinách a tenkém střevě. Při cholestáze je aktivita GMT v krvi výrazně zvýšená. Dále bývá zvýšená při chronických hepatopatiích různé etiologie.

**Kreatinkináza (CK)** je enzym přítomný ve velkém množství v kosterní svalovině. Při poškození svalů dochází k jeho zvýšení. Vysoká koncentrace tohoto enzymu v krevním séru je při myodystrofiích v důsledku karence selenu a u ulehých zvířat v důsledku hypoxie svalů. Ke zvýšení koncentrace CK dochází i při svalové námaze.



**Laktátdehydrogenáza (LD)** je intracelulární enzym lokalizovaný v cytoplazmě buněk různých tkání, a proto není orgánově specifický. U skotu k jeho zvýšení dochází především při dystrofii jater.

**Alkalická fosfatáza (ALP)** se vyskytuje ve formě izoenzymů - kostní, jaterní a střevní. Vyšší aktivita ALP je fyziologická u mladých zvířat a patologická při osteopatiích, při nekrotázách hepatocytů a zánětech žlučvodů.

**Hodnota celkového bilirubinu (TBIL)** vypovídá o jaterním metabolismu. Mírný vzestup koncentrace bilirubinu nastává při dystrofiích jater, výraznější zvýšení je analyzováno při jaterním selhání a několikanásobné výrazné zvýšení je charakteristické při hemolytickém ikteru.

#### **5.3.4 Vitamínový profil**

Vitamíny jsou biologicky aktivní látky významně ovlivňující intermediární metabolismus, jejichž koncentrace stanovujeme v krevní plazmě, krevním séru či jaterní tkáni. U skotu je nezbytné všechny vitamíny s výjimkou vitamínů skupiny B a vitamínu C dodávat v krmné dávce. Hypovitamínózy probíhají většinou subklinicky s nespecifickými příznaky, jako jsou snížená užitkovost nebo poruchy reprodukce. Hypovitamínózy projevující se typickými klinickými příznaky jsou u dospělého skotu poměrně vzácné. Relativně časté jsou u telat a kůzlat.

**Vitamín A** (retinol) je u skotu jedním z nejdůležitějších vitamínů. Kumuluje se v játrech a je vylučován prostřednictvím kolostra, mléka, výkalů a moči.

Nedostatek vitamínu A může vyvolat poruchy vidění (šeroslepost), defektní růst kostí, poruchy reprodukce, keratinizaci epitelů s poruchou jejich funkcí a zvýšenou náchylnost k patogenům. V případě subklinické formy je vhodné stanovení vitamínu A a  $\beta$ -karotenu v krevní plazmě (séru).

**Vitamín E** ( tokoferol) se skládá z celé řady složek, ze kterých je nejvýznamnější  $\alpha$ -tokoferol zajišťující až 95 % z celkové funkce vitamínu E. Tokoferoly jsou syntetizovány pouze v zelených rostlinách a jejich příjem do organismu je vázán na vstřebávání tuků. Novorozená telata jsou z větší části závislá na příjmu vitamínu E kolostrem a mlékem, jelikož vitamíny rozpustné v tucích přes placentu skotu téměř nepřestupují. Vitamín E je důležitým účastníkem oxidoredukčních procesů, má významný antioxidační účinek.

Nedostatek vitamínu E vyvolává poruchy imunitního systému a spolu s karencí selenu je spojován s celou řadou klinických poruch zdravotního stavu, jako jsou nutriční myopatie (především nutriční svalová dystrofie), poruchy imunitních funkcí, mastitidy, poruchy reprodukce (u samic především zadržetí lůžka, zatímco u samců hlavně degenerativní změny spermatogonií, snížená koncentrace spermií, snížená motilita spermií a zvýšený výskyt jejich strukturálních abnormalit) a kardiovaskulární onemocnění. Klinické příznaky typické pro deficit vitamínu E jsou náhlé úhyny zvířat po zátěži, celková slabost, pohybové potíže, poruchy srdeční činnosti, poruchy dýchání, třes, poruchy sání telat (a další příznaky doprovázející svalovou dystrofii), zvýšená nemocnost a úhyny telat, zaostávání zvířat, snížená užitkovost, zhoršování kvality mléka, výskyt mastitid a poruchy reprodukce.

**β-karoten** neboli provitamin A je prekurzorem vitamínu A. Tento karotenoid je nezbytnou součástí dietní výživy skotu z důvodu zajištění optimální plodnosti. Nedostatek β-karotenu se projevuje oslabenou nebo tichou říjí, zpožděnou ovulací či zadržetím plodového lůžka. Nízká koncentrace β-karotenu v krvi je často možným důvodem sníženého samčího libida. β-karoten spolu s vitamínem A jsou jedním z faktorů, které ovlivňují vývoj telete již v těle matky. Jejich nedostatečná koncentrace v krvi matky může být příčinou vážných defektů plodu a v nejhrošším případě až úhynu.

### 5.3.5 Acidobazická rovnováha

Dle hodnot parametrů pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SB - standardní bikarbonát) a BE lze posoudit acidobazickou rovnováhu nebo diagnostikovat konkrétní acidobazickou poruchu a stupeň její kompenzace. Referenční hodnoty parametrů ABR u dojnic jsou uvedeny v Tab 6.

**Tab 6: Referenční hodnoty parametrů ABR u skotu**

Parametr	Fyziologická hodnota
pH	7,38 - 7,44
pCO <sub>2</sub>	5,2 - 6,4 kPa
cHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23,5 - 27,0 mmol/l
BE	-0,5 - 4,5 mmol/l

**Stanovení pH** je důležité pro základní rozlišení acidobazických poruch a pro posuzování stavu kompenzace. Při vzestupu koncentrace vodíkových iontů a acidemii se hodnota pH krve

snižuje a při poklesu koncentrace vodíkových iontů, alkalemii hodnota pH krve stoupá nad 7,44.

**Hodnota parciálního tlaku CO<sub>2</sub>** vyjadřuje vztah mezi produkcí CO<sub>2</sub> ve tkáních a CO<sub>2</sub> vydechovaným plicemi. Vzácná respirační alkalóza vznikající v důsledku zvýšené výměny plynu v plicích po přímém dráždění dýchacích center při infekčních onemocnění, intoxikací NH<sub>3</sub> a po dráždění respiračních receptorů při hypoxii je charakterizovaná primárně sníženou hodnotou pCO<sub>2</sub>. Při poruchách ventilace plic nebo depresi respiračních center vzniká respirační acidóza charakterizována naopak primárním zvýšením hodnoty pCO<sub>2</sub>.

K sekundárnímu zvýšení pCO<sub>2</sub> může dojít při odběru vzorků při přílišné komprimaci vény. Primární metabolická alkalóza a acidóza mohou být kompenzovány, což sekundárně mění hodnotu pCO<sub>2</sub>. Stupeň kompenzace hodnotíme dle pH krve.

Z důvodu nedostatků ve výživě (acidóza bachorového obsahu, vysoký příjem acidogenně působících krmiv, nedostatek strukturální vlákniny, nerovnováha v příjmu minerálních živin nebo vysoký příjem chloridů), katabolických procesů v organismu, průjmů, poruch funkce orgánů podílejících se na regulaci acidobazického stavu (jater, ledvin) vzniká metabolická acidóza charakteristická sníženou hodnotou všech nebo pouze některých z výše uvedených ukazatelů. V důsledku nedostatků ve výživě (nadbytek bílkovin, vysoké dávky močoviny, nadbytek NaHCO<sub>3</sub>, MgO, CaCO<sub>3</sub> v krmné dávce, alkalóza bachorového obsahu), poruch funkce některých orgánů - slezu (dislokace) nebo ledvin vzniká metabolická alkalóza charakteristická zvýšenou hodnotou všech nebo pouze některých z výše uvedených ukazatelů

**Tab 7: Patognomické analyty ABR**

	pH	pCO <sub>2</sub>	BE	cHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>Fyziologická hodnota</b>	7,36 – 7,44	5,2 – 6,4	-0,5 – 4,5	23,5 – 27,0
<b>Metabolická acidóza</b>	↓	-	↓	↓
<b>Metabolická acidóza kompenzovaná</b>	-	↓	↓	↓
<b>Metabolická alkalóza</b>	↑	-	↑	↑
<b>Metabolická alkalóza kompenzovaná</b>	-	↑	↑	↑
<b>Respirační acidóza</b>	↓	↑	-	-
<b>Respirační alkalóza</b>	↑	↓	-	-

### 5.3.6 Močový profil

V rámci vyšetření metabolismu dojníc se využívá i vyšetření moči, které poskytuje řadu informací pro zpřesnění závěrů vyšetření krve a bachorové tekutiny. Pro zpřesnění vyšetření acidobazické rovnováhy se využívá stanovení pH moči. Pro hodnocení energetického metabolismu se stanovují ketolátky a močovina. Další parametry sledované v moči informují o dotaci minerálních látek nebo o klinických chorobách některých orgánových systémů, zejména ledvin (Tab 8).

**Tab 8: Referenční hodnoty parametrů stanovovaných v moči u skotu**

Parametr	Fyziologická hodnota
pH	7,8 - 8,4
Poměrná hustota	1,030 - 1,045
Ketolátky	do 100 mg/l
Bílkoviny	do 150 mg/l
Bilirubin	do 1,75 $\mu$ mol/l
Urea	130 - 300 mmol/l
Na	20 - 80 mmol/l
K	140 - 320 mmol/l
Ca	0,12 - 1,50 mmol/l
Mg	6,17 - 16,46 mmol/l
P	0,32 - 5,17 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	40 - 160 mmol/l

**Tab 9: Referenční hodnoty biochemických parametrů u velkých zvířat**

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA	PRASE	KŮŇ
Celková bílkovina (CB)	g/l	65 – 85	60 – 90	60 – 80	65 – 90	55 – 75
Albumin (ALB)	g/l	30 – 40	25 – 30	27 – 39	19 – 39	28 – 38
Urea	mmol/l	3,5 – 6,0	3,0 – 7,2	3,0 – 7,2	3,6 – 8,0	3,6 – 6,0
Kreatinin (CREAT)	μmol/l	88 – 177	106 – 168	88 – 159	120 – 220	106 – 168
Celkový bilirubin (TBIL)	μmol/l	0,2 – 5,0	1,7 – 5,0	0,1 – 2,0	0,1 – 20,0	7,0 – 35,0
Alaninamino-transferáza (ALT)	μkat/l	0,1 – 0,3	max. 0,4	max. 0,4	0,5 – 1,0	
Amyláza (AMS)	μkat/l	0,4 – 2,0				
Aspartátamino-transferáza (AST)	μkat/l	0,7 – 1,4	0,6 – 1,5	0,6 – 1,8	0,5 – 1,5	3,7 – 6,0
Alkalická fosfatáza (ALP)	μkat/l	0,1 – 1,6	1,1 – 6,5	1,5 – 6,5	2,0 – 6,6	2,4 – 6,6
Gama-glutamyl-transferáza (GMT)	μkat/l	0,1 – 0,6	0,1 – 0,8	0,1 – 0,8	0,1 – 1,0	0,0 – 0,2
Kreatinkináza (CK)	μkat/l	0,1 – 3,0	0,1 – 2,0	0,1 – 2,0	0,1 – 8,0	0,1 – 0,5
Laktát-dehydrogenáza (LDH)	μkat/l	16,3 – 29,0	10,0 – 24,0	10,0 – 15,0		
Glutation-peroxidáza (GPX)	μkat/l	800 – 1200	800 – 1200	700 – 1000	800 – 1300	400 – 800
Glukóza (GLU)	mmol/l	3,0 – 5,0	2,8 – 4,4	2,8 – 4,2	4,7 – 8,3	4,2 – 6,4
Beta-hydroxybutyrát (BHB)	mmol/l	0,1 – 0,8	0,1 – 0,8	0,1 – 0,8		
NEMK	mmol/l	0,10 – 0,55	0,10 – 0,40	0,10 – 0,40		
Cholesterol (CHOL)	mmol/l	2,0 – 3,2	1,3 – 2,0	2,1 – 3,4	1,0 – 1,4	1,9 – 3,9

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA	PRASE	KUŇ
Triacylglyceroly (TAG)	mmol/l	0,10 – 0,50	0,15 – 0,50	0,25 – 0,80		0,10 – 0,50
Vitamín A	μmol/l	1,10 – 2,00	0,75 – 1,60	0,75 – 1,60		
Vitamín E	μmol/l	6,0 – 12,0	5,0 – 10,0	5,0 – 10,0		
β-karoten	μmol/l	8 – 16				
Trijodtyronin (TT3)	nmol/l	1,5 – 2,0	1,5 – 2,0	1,5 – 2,0		
Tyroxin (TT4)	nmol/l	60 – 80	60 – 80	60 – 80		

## 6 Vyšetření minerálních prvků

Vyšetření minerálních prvků se provádí v rámci biochemického vyšetření, při němž se stanovují makroprvky (Ca, P, Mg, Na, K) a mikroprvky (Se, Mn, Fe, Cu, Zn). Tohoto vyšetření se hojně využívá při hodnocení výskytu metabolických poruch. Makroprvky jsou v organismu zodpovědné za řadu funkcí a jsou řízeny složitými regulačními mechanismy, proto je ke správnému určení typu poruchy nutné sledovat nejenom koncentraci těchto prvků v krevní plazmě (séru), ale i v moči. Naopak koncentrace mikroprvků neboli stopových prvků se sleduje především z důvodu diagnostiky jejich karence. Pro správnou činnost organismu je nezbytná dynamická rovnováha všech minerálních látek. Problémy jsou tedy způsobovány nedostatečným i nadměrným příjmem jednotlivých minerálních prvků. Koncentrace těchto látek se stanovuje v krevním séru nebo krevní plazmě. U některých prvků je možné využít ke stanovení i plnou krev, ve které jsou očekávány vyšší hodnoty koncentrací.

Výsledné hodnoty mohou poukazovat na určitá onemocnění. Příkladem je poporodní paréza z důvodu hypokalcémie, ulehnutí nebo onemocnění končetin způsobené hypofosfatémií, pastevní tetanie z nedostatku hořčíku, nutriční svalová dystrofie při karenci selenu nebo problémy se srstí při nedostatku zinku nebo mědi. Nelze stanovit diagnózu na základě jediného vyšetření, proto jsou souhrnně posuzována veškerá vyšetření a celkový zdravotní stav zvířete.

### 6.1 Preanalytická fáze

Koncentrace minerálních prvků metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) se stanovuje v různých biologických materiálech, mezi které patří tělní tekutiny (krev, moč), tkáň, mléko, srst, krmiva, kosti, výkaly. Stanovení minerálních prvků v krvi lze provádět ze séra i z plazmy. Mezi výjimky se řadí stanovení selenu a manganu, které se provádí z plné krve.

#### 6.1.1 Odběr vzorku

Krev se na vyšetření minerálních prvků odebírá za použití odběrky Hemos-02 nebo speciálních zkumavek. Místa odběru u jednotlivých druhů zvířat jsou uvedena v Tab 1.

### 6.1.1.1 Sérum



Krev se odebírá do hemosek bez antikoagulačního činidla (Obr 71) nebo do zkumavek s urychlovačem srážení. Po odběru dochází k pozvolnému srážení krve, které probíhá v rozmezí 12 - 24 hod. Tento proces lze urychlit zvýšením teploty – srážení krve v termostatu při 37 °C.

**Obr 71:**  
**Oběr krve u koně**

Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobující hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- uchování vzorku při pokojové teplotě (18 - 25 °C)
  - nedodržení teploty → špatné srážení vzorku/hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny

Po sražení vzorku se sérum získá následnou centrifugací po dobu 10 min při zrychlení 3000 ot/min. Sérum lze použít přímo ke stanovení, případně uchovat v lednici nebo pro pozdější užití lze zamrazit.

### 6.1.1.2 Plná krev a plazma

Při vyšetření parametrů z plné krve a plazmy je nutno k odebranému vzorku přidat



protisrážlivé činidlo (Obr 72). Jako antikoagulant se nejčastěji používá heparin. K odběru slouží komerčně vyrobené zkumavky již s heparinem nebo čisté hemosky či zkumavky s přidanými 2-3 kapkami heparinu.

**Obr 72: Vhodný odběrový materiál pro odběr nesrážlivé krve (plná krev, plazma)**



Při odběru musí být dodrženy tyto zásady:

- zabránění mechanických vlivů způsobující hemolýzu (stlačení odběrového materiálu v místě s již odebranou krví kvůli nízkému podtlaku v hemosce, prudké třepání vzorku) → hemolytický vzorek → výsledky ovlivněny
- promíchání krve ihned po odběru
  - pokud nedojde k promíchání antikoagulantu s krví, vzorek se srazí → vzorek nelze použít
- uchování vzorku v chladu - lednice (4 °C)

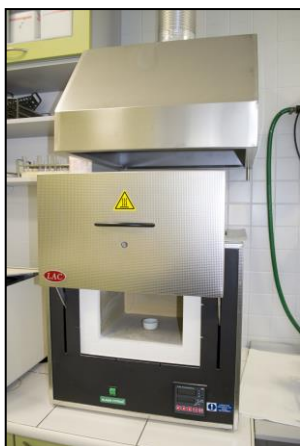
Plnou krev lze použít přímo ke stanovení daných parametrů. Plazma se získá centrifugací vzorku (10 min, 3000 ot/min). Vzorky se uchovávají v lednici nebo pro pozdější užití je lze zamrazit.

## 6.2 Analytická fáze

Stanovení minerálních prvků se provádí pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS). Před stanovením koncentrací důležitých prvků v různých biologických materiálech je třeba vzorky převést do kapalné formy - mineralizace (rozklad). Tato mineralizace se provádí v případě stanovení koncentrace selenu a manganu ve všech biologických materiálech (i krev). Při měření koncentrace ostatních minerálních prvků (Na, Ca, K, Mg, Zn, Cu, Fe) se nemineralizují pouze vzorky krve. Přehled referenčních hodnot jednotlivých minerálních prvků je uveden v Tab 11.

### 6.2.1 Příprava vzorku

**Mineralizaci - rozklad** vzorku je možné provést dvěma způsoby:



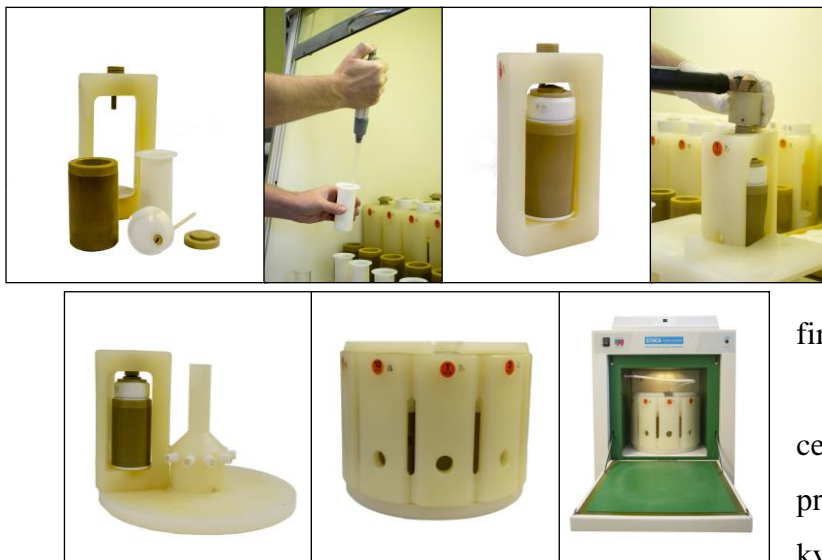
Obr 73: Muflonová pec

- suchou cestou

Tento způsob patří mezi nejstarší metody a je využíván hlavně ke stanovení poměru Ca/P v kostech. Vzorek kosti ve tvaru válečku délky asi 1 cm a průměru asi 0,8 cm je v keramickém kelímku spálen v píce (Obr 73). Jedná se tedy o rozklad suchou cestou v otevřeném systému - bez použití jakýchkoliv roztoků a v neuzavíratelných nádobách. Samotnému rozkladu předchází ještě dva další kroky. Extrakce - odmaštění vzorku kosti dietylerem (zbavení tuku) a sušení vzorku kosti.

- mokrou cestou

Rozklad mokrou cestou probíhá ve směsi koncentrovaných minerálních kyselin za vyšší teploty a tlaku. Mokrý rozklad v uzavřeném systému se řadí mezi nejvýhodnější možný způsob mineralizace vzorku. Umožňuje zabránit ztrátám těkavých prvků, zamezit kontaminaci z vnějších zdrojů a snižuje spotřebu reakčních činidel.



K mineralizaci vzorků pro stanovení důležitých prvků se využívá tzv. **mikrovlnný rozklad**, který se provádí v mikrovlnné pídce od

firmy Milestone. Základem je rozklad mokrou cestou v uzavřeném systému - probíhá ve směsi minerálních kyselin a oxidovadel

**Obr 74: Mineralizace – mikrovlnný rozklad**

ve speciálních uzavřených

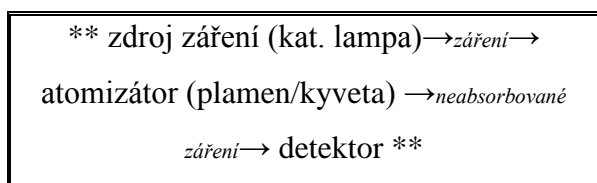
teflonových patronách za zvýšené teploty a tlaku (Obr 74). Tento způsob využívá mikrovln, které zkracují dobu mineralizace. Podle stanovovaného prvku se volí různé navážky vzorků a podle použitého biologického materiálu různý program pro mineralizaci vzorku (nastavení teploty, tlaku a času).

Pro stanovení koncentrace selenu je třeba provést **odpařování vzorku**. Přístroj Milestone je vybaven i odpařovacím systémem a umožňuje odpařit vzorek do minimálního objemu (Obr 75). Odpařením vzorku se na jedné straně prodlouží doba přípravy, na straně druhé se ale odstraní nadbytečné množství kyselin, velké ředění a zvýší se citlivost stanovení.



## 6.2.2 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) patří mezi optické spektrální metody, které jsou založeny na výměně energie mezi látkou a zářením. Spektrum je závislost veličiny, která je mírou intenzity záření prošlého vzorkem, na vlnové délce záření  $\lambda$ . Metoda AAS je založena na absorpci vhodného elektromagnetického záření volnými atomy prvku a vychází z Kirchhofova zákona, který říká, že každá látka pohlcuje záření té vlnové délky, kterou sama může vyzařovat. Jako zdroj záření je proto nutno použít stejný prvek, který chceme stanovovat. Principem AAS je měření úbytku záření absorpcí záření volnými atomy stanovovaného prvku. Zásadní podmínkou pro měření koncentrace prvku je převedení atomů analyzovaného prvku do stavu, kde převažuje výskyt nenabitých volných atomů analytu - atomizace vzorku. Optický detektor měří intenzitu prošlého záření o specifické vlnové délce (Obr 83, 84). Koncentrace stanovovaného prvku je podle Lambertova-Beerova zákona přímo úměrná sledované absorbanci.



*Zdroj záření - katodová lampa (výbojka s dutou katodou)*

Vyzařuje záření o dané vlnové délce. Katodou je dutý váleček ze stejného prvku, který se stanovuje, a anodou je wolframový drát (Obr 77).



Obr 77: Katodová lampa

*Atomizátor - plamen/grafitová kyveta*

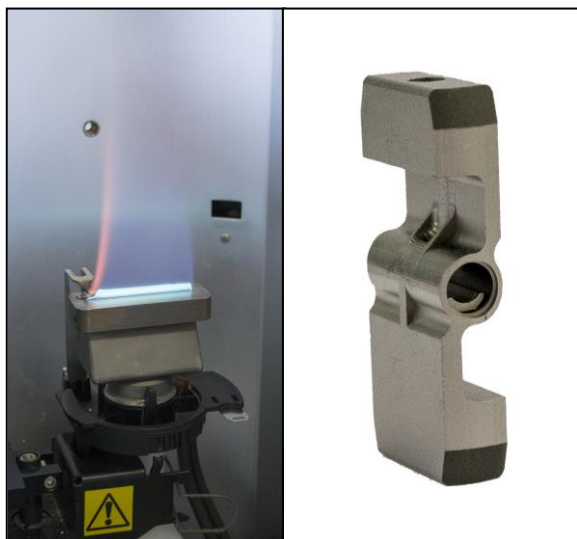
Slouží k atomizaci vzorku - převedení vzorku do stavu volných atomů. Vzorek je atomizován při vysoké teplotě 2000 - 3000 °C. Používá se atomizátor plamenový nebo elektrotermický (Obr 79).

- **Plamenový atomizátor** využívá plamene acetylen/vzduch. Aerosol vzorku je smíšen s topným plynem (acetylen) a oxidovadlem (vzduch) a je vnášen do plamene, kde se atomizuje. Pomocí plamene se stanovují koncentrace **Na, K, Ca, Mg** v mmol/l a **Zn, Cu, Fe** vyjadřované v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$ .



Obr 78: Nasávání vzorku, měření koncentrace Ca

- **Elektrotermický atomizátor** (grafitová kyveta) je tvořen grafitovou trubicí, která je vyhřívána elektrickým proudem. Vzorek se na vnitřní stěnu trubice vnáší pomocí mikropipety automatického dávkovače. Teplotní cyklus má tři fáze:
  - sušení (50 - 200 °C) - odpaření rozpouštědla
  - pyrolýza (200 - 800 °C) - termický rozklad organických materiálů bez přístupu vzduchu
  - atomizace - prudké zahřátí během několika sekund na teplotu 2000 - 3000 °C



Výhodou elektrotermického atomizátoru je zvýšení citlivosti stanovení. Využívá se k měření koncentrace **Mn, Cd, Pb a Co**, která je vyjadřovaná v jednotkách  $\mu\text{g/l}$ .

#### *Detektor + vyhodnocovací zařízení*

Jako detektor slouží fotonásobič napojený na vyhodnocovací zařízení. Pracuje se metodou kalibrační křivky – srovnávací (Obr 85). Před každým měřením se musí provést kalibrace

**Obr 79: Plamen a grafitová kyveta**

pomocí minimálně tří standardů o různé

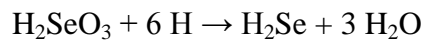
koncentraci stanovovaného prvku. Vytvořená kalibrační křivka slouží k přepočtu naměřené absorbance vzorku na koncentraci prvku ve vzorku. Po kalibraci se jako první měří slepý vzorek - blank, kterým je vždy ředící roztok použitý při stanovení daného minerálního prvku. Jednotlivé vzorky jsou měřeny na přístroji po nastavení nulové koncentrace daného prvku pomocí blanku (Obr 78).

Stanovení selenu nelze provést pomocí plamenové (F AAS) ani elektrotermické atomové absorpční spektrometrie (ET AAS). K měření koncentrace selenu se využívá **hydridová**

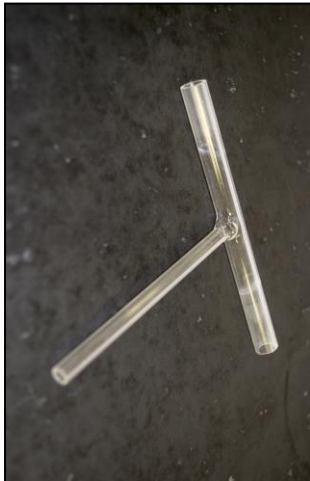


**Obr 80: Přídavná hydridová jednotka**

**technika atomové absorpční spektrometrie (HG AAS).** Přídavná hydridová jednotka umožňuje reakci kyselého roztoku vzorku s tetrahydridoboritanem sodným za vzniku plynného hydridu prvku. Reakcí  $\text{H}^+$  a  $\text{BH}_4^-$  se uvolňuje atomární vodík, který pak redukuje sloučeninu analytu na hydrid.



Hydridový generátor, v kterém probíhá výše uvedená reakce, se skládá z čerpadla pro vzorek a činidlo, reaktoru (nádobka) a separátoru fází. Ke **stanovení Se** se využívá **kontinuální hydridový generátor** (Obr 80, 81). Roztok vzorku, NaBH<sub>4</sub> a



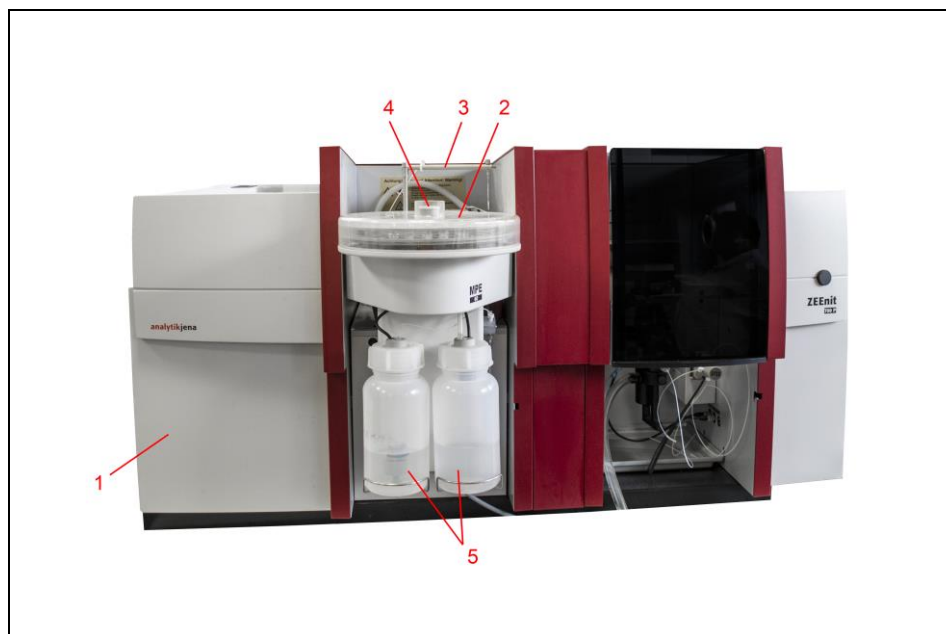
Obr 82: Křemenná T-trubice

kyselina se nasávají peristaltickým čerpadlem. V kapiláře vznikají bublinky plynu (vodík + hydrid). Tok kapaliny a plynu vstupuje do fázového separátoru.

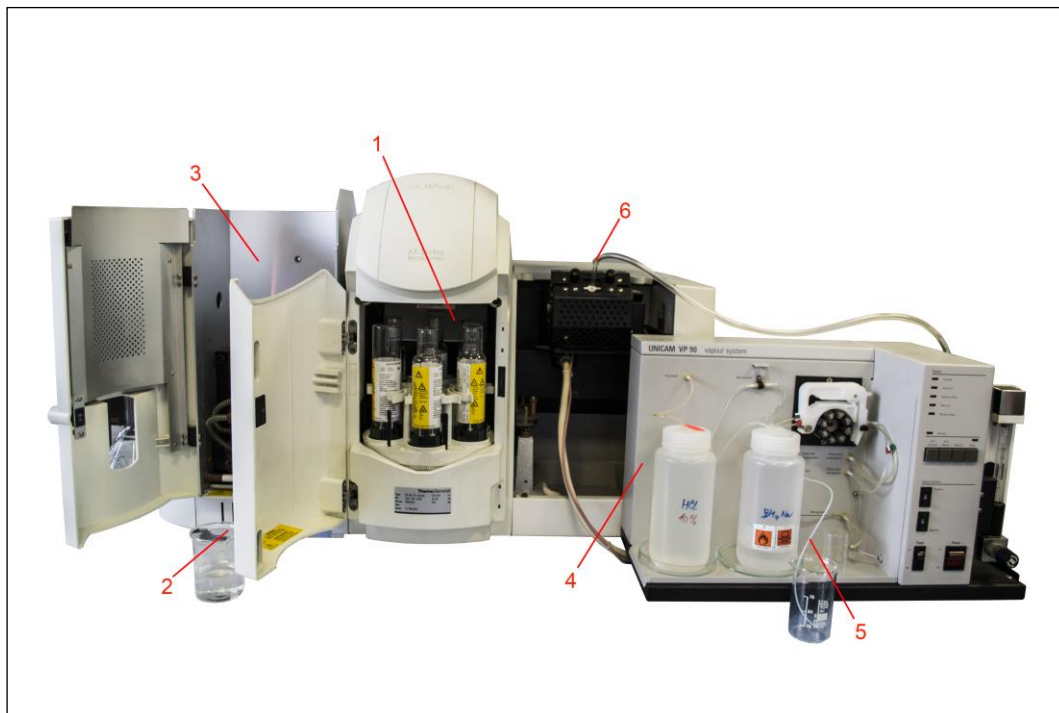


Obr 81: Nasávání vzorku, měření koncentrace Se

Vzniklý plyn je přiváděn do *atomizátoru* – křemenná trubice ve tvaru T vyhřívána elektricky (Obr 82). Měří se ustálená hodnota absorbance. Koncentrace Se je vyjadřována v jednotkách µg/l.



Obr 83: Duální atomový absorpční spektrometr – Zeenit 700 P, Analytik Jena: (1) katodové lampy; (2) otočný karusel se vzorky; (3) dávkovací jehla; (4) grafitová kyveta; (5) promývací roztok a odpad



**Obr 84: SOLAAR (thermo elektron corporation): (1) katodové lampy; (2) nasávání vzorku; (3)plamen; (4) přídavná hydridová jednotka; (5) nasávání vzorku; (6) T-trubice**

Use SFI: No

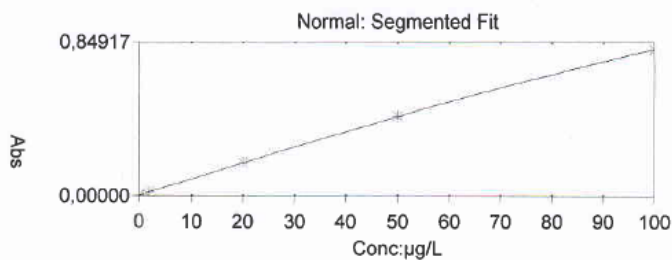
### Analysis Details

Analysis Name: Se Kaz7, Bernardy kr 12.10.2015  
Operator Name: KALUZOVAA

Spectrometer: M Series 650062 v1.30

### Solution Results - Se

Min Curvature: 0%  
Max Curvature: 8%  
Characteristic Conc: 0,4917



Sample ID	Signal Abs	Rsd %	Conc µg/L	Corrected Conc µg/L
Se Blank	0,000		0,0000	
Se Standard 1	0,021		2,0000	
Se Standard 2	0,179		20,0000	
Se Standard 3	0,436		50,0000	
Se Standard 4	0,809		100,0000	
Se WB L-1	0,053		5,9238	59,2384
Se Kaz 7 bo 114	0,303		34,1543	170,7715
Se 115	0,393		44,8418	224,2090
Se 116	0,259		29,1019	145,5097
Se 117	0,272		30,6400	153,1999
Se 118	0,302		34,0516	170,2578
Se 119	0,272		30,5583	152,7916
Se 120	0,263		29,5578	147,7889
Se 121	0,209		23,4082	117,0409
Se 122	0,236		26,4823	132,4113
Se 123	0,243		27,2992	136,4958
Se 124	0,222		24,8596	124,2980
Se 125	0,284		31,9185	159,5925
Se 126	0,242		27,1170	135,5851
Se 127	0,262		29,4223	147,1115
Se 128	0,246		27,6400	138,1998
Se 129	0,321		36,2186	181,0929
Se 130	0,316		35,6177	178,0885
Se 131	0,334		37,8245	189,1223
Se 132	0,242		27,1155	135,5775
Se 133	0,245		27,4887	137,4434
Se 134	0,257		28,8635	144,3175
Se 135	0,297		33,4277	167,1387
Se 136	0,279		31,3801	156,9006
Se 137	0,311		35,1216	175,6080
Se 138	0,313		35,2764	176,3820
Se 139	0,270		30,3588	151,7941
Se 140	0,243		27,2855	136,4274
Se IAEA-A-13	0,030		3,3368	166,0112
Se Bernardy bo 1	0,424		48,5026	242,5128
Se 2	0,355		40,2778	201,3891
Se 3	0,304		34,2351	171,1756
Se 4	0,310		34,9695	174,8474
Se 5	0,284		31,9584	159,7922
Se 6	0,377		42,8914	214,4569
Se 7	0,337		38,1254	190,6271
Se 8	0,300		33,8573	169,2865
Se 9	0,368		41,8063	209,0316
Se 10	0,314		35,4543	177,2715
Se 11	0,403		46,0286	230,1430
Se 12	0,268		30,1550	150,7752

Obr 85: Protokol stanovení koncentrace Se



### 6.3 Postanalytická fáze

Minerální prvky obsažené v organismu živočichů tvoří 4 až 5 % jejich hmotnosti. Biologická významnost jednotlivých minerálních látek je veliká a každá porucha metabolismu či změna koncentrace v biologických tekutinách a tkáních ovlivňuje řadu fyziologických a zejména biochemických procesů a tím metabolismus organismu jako celek. Za fyziologických stavů jsou všechny minerální prvky v organismu v dynamické rovnováze, která je řízena homeostatickými mechanismy. Základním předpokladem udržení dynamické rovnováhy minerálních látek a jejich koncentrace v tkáních a biologických tekutinách je adekvátní přísun krmiv, jejich utilizace a regulace. Jak nedostatečný, tak i nadměrný příjem minerálních prvků působí na organismus nepříznivě. Jednotlivé minerální prvky nepůsobí v organismu samostatně, ale vždy ve vzájemných souvislostech. Jsou důležitou součástí všech tkání a orgánů organismu. Mají funkci **strukturální** (podílí se na strukturálním uspořádání skeletu, zubů, struktury proteinů a buněčných membrán), **fyziologickou** (podílí se na procesech trávení, vstřebávání, udržování osmotického tlaku a acidobazické rovnováhy, permeability membrán, nervosvalové dráždivosti, přenosu vzruchu, reprodukčních funkcí), **katalytickou** (působí jako katalyzátory enzymatických systémů) a **regulační** (regulují metabolické pochody - jod jako součást T3 a T4, zinek jako součást inzulinu). Pro uvedené funkce a strukturální integritu tkání musí být zachována jejich optimální koncentrace a vzájemný poměr.

Poruchy minerálního metabolismu jsou u skotu, malých přežvýkavců i prasat poměrně časté. Vyskytují se jako subklinické nebo klinické formy onemocnění. Diagnostika těchto poruch vyžaduje laboratorní vyšetření, které zpravidla spočívá ve stanovení koncentrace jednotlivých minerálních prvků v krvi, krevním séru, krevní plazmě, moči, mléku či tkáních. Vzhledem k dobrým regulačním mechanismům probíhají poruchy minerálního metabolismu dlouhou dobu jako subklinické poruchy, ale i tak mají negativní dopad na celkové zdraví, produkci a reprodukci. Z těchto důvodů je kladen požadavek na přesnost analytických metod, neboť změny v koncentracích minerálních prvků bývají malé. Výrazné změny jsou již doprovázeny klinickými příznaky onemocnění.

#### 6.3.1 Makrominerální profil

**Vápník** je minerální prvek vyskytující se ve všech buňkách a tkáních. Jeho metabolismus je velmi dobře regulován. Pro diagnostiku se stanovuje jeho koncentraci v krevním séru, moči a kostní tkáni. K výraznému snížení hodnot koncentrace vápníku v krevním séru dochází při

porodní paréze krav. K mírnému snížení koncentrace dochází u vysokoprodukčních dojnic v prvních deseti až patnácti dnech laktace, dále při osteoporóze, rachitidě, při onemocnění ledvin, při hypoproteinémii, kachexii a metabolické acidóze. Doplnujícím vyšetřením je stanovení aktivity alkalické fosfatázy, zvláště u telat a mladého skotu. Nejvhodnější metodou diagnostiky osteopatií je analýza kostní tkáně (stanovení popela, Ca a P v kostní tkáni). V ojedinělých případech dochází i ke zvýšení koncentrace vápníku v krevním séru a to při předávkování vitamínu D, při zvýšené činnosti příštítné žlázy a krátkodobě i při frakturách kostí. V moči je koncentrace vápníku nízká, zvyšuje se však při proteinurii a při rychlé osteolýze.

**Fosfor** je minerální prvek vyskytující se v anorganické i organické formě ve všech buňkách, tkáních a biologických tekutinách organismu. V organismu zastává stavební funkci, podílí se na fosforylaci, přenosu energie a detoxikační činnosti a zasahuje do acidobazických procesů. Jeho snížená koncentrace indikuje nedostatek fosforu v krmné dávce, nedostatek vitamínu D, hypofosforemické ulehnutí dojnic, hemoglobinurii, osteomalacii a rachitidu. Zvýšená koncentrace fosforu nastává při vyšším příjmu fosforu, metabolické acidóze, intenzivní demineralizaci kostní tkáně, předávkování vitamínem D a při onemocnění ledvin.

**Hořčík** je minerální prvek plnící funkci významného aktivátoru řady enzymů. Zásoby hořčíku schopné uvolnit se do krevního oběhu jsou relativně malé a jeho obsah v krevní plazmě závisí na množství přijatém v KD. Ke snížení koncentrace hořčíku dochází při nedostatečném příjmu hořčíku, při stájové, pastevní, transportní tetanii skotu a při mléčné tetanii telat. Relativní nárůst koncentrace hořčíku v krevní plazmě nastává při porodní paréze, mírný nárůst při metabolické acidóze.

**Sodík** je extracelulární kationt, který je velmi jemně regulován. K významným změnám v koncentraci sodíku u krav nedochází. I při značné karenci jeho koncentrace zásluhou reabsorpce v ledvinách zůstává v krvi ve fyziologickém rozmezí. Hyponatrémie nastává u telat při profuzních průjmech. Diagnostický význam má stanovení koncentrace sodíku v moči. Při nedostatečném příjmu sodíku je koncentrace sodíku v moči velmi nízká, při vysokém příjmu sodíku se sodík vylučuje ve zvýšené míře močí a výkaly. Při intoxikaci solí, ke které dochází zpravidla u prasat, se zvyšuje koncentrace sodíku v krevním séru i moči.

**Draslík** je intracelulární kationt, jehož koncentrace v krevním séru je relativně stabilní, ale jeho regulace není tak dokonalá jako u sodíku. Zvýšená koncentrace draslíku v krevním séru nastává při zvýšeném příjmu draslíku krmnou dávkou, při metabolické acidóze a při

onemocnění ledvin. Ke snížení koncentraci draslíku dochází u krav v době porodu při porodní paréze, při narkóze, dislokaci slezu a při deficitu draslíku u vysokoprodukčních dojnic.

**Chloridy** jsou extracelulárním aniontem a jejich koncentrace je poměrně stabilní.

Homeostáza chloridů probíhá v závislosti na sodíku, draslíku a bikarbonátu. K hypochloremii dochází při ileu a při dislokacích slezu. Ke zvýšení koncentrace chloridů dochází ojediněle a to při závažném onemocnění ledvin.

### 6.3.2 Mikroelementový profil

Mikroelementy, též označované jako stopové prvky, jsou na rozdíl od makroelementů v tkáních a orgánech obsaženy ve velmi malém množství. Mají však mimořádný význam v řadě katalytických, enzymatických i regulačních procesů. Jsou pro život nezbytné a nemohou být nahrazeny jinými prvky. U skotu, malých přežvýkavců i prasat se vyskytují karence stopových prvků, při zvýšeném příjmu však vznikají intoxikace některými stopovými prvky. Diagnostika karencí i intoxikací je založena na stanovení koncentrace jednotlivých stopových prvků v krevním séru, plné krvi, v játrech, případně v ledvinách. Diagnostický význam mají i některé enzymy (GPX) a organické sloučeniny (hemoglobin).

**Selen** je biogenní prvek, který je obsažen ve všech buňkách, tkáních i tekutinách organismu. Je nezbytný pro mnoho biochemických funkcí na celulární i subcelulární úrovni a nemůže být nahrazen jinými prvky. Základní funkcí selenu spolu s vitamínem E je obrana buněk před působením volných kyslíkových radikálů. Je to nejvýznamnější antioxidant. Zatímco vitamín E chrání buněčnou membránu, selen prostřednictvím GPX chrání cytoplazmu buněk. Selen je v organismu obsažen i v dalších sloučeninách. Jsou to selenometionin, selenocystein, deiodázy, selenoprotein P, selenoprotein W, thioredoxin reduktáza a další. Selen ovlivňuje imunitu, plodnost samic i samců. Nedostatek selenu vyvolává myodystrofii, hyalinní degeneraci myokardu, degeneraci jater a ledvin, způsobuje poruchy imunity. Zvýšený příjem selenu vyvolává intoxikaci.

Diagnostika karencí selenu spočívá ve stanovení koncentrace selenu v plné krvi, mléku, či ve stanovení aktivity GPX v krvi. V krevním séru dochází ke zvýšení aktivity enzymů CK a AST. Při intoxikaci selenem dochází k významnému zvýšení koncentrace selenu v krvi, v játrech a ledvinách.

**Zinek** je obsažen ve všech buňkách organismu. Jeho nejvyšší podíl je ve svalech a skeletu. Zinek je součástí a aktivátorem mnoha enzymů - karboanhydrázy, laktátdehydrogenázy, alkalické a kyselý fosfatázy, superoxiddismutázy, peptidáz, deamináz a dalších.

Prostřednictvím těchto enzymů zasahuje do řady biochemických reakcí na celulární i subcelulární úrovni. Je důležitý pro syntézu proteinů, metabolismus skeletu, růst zvířat, fyziologické procesy v kůži a kožních derivátech. Ovlivňuje vývoj pohlavních orgánů a jejich činnost. Je součástí inzulínu a zasahuje do energetického, proteinového i minerálního metabolismu. Má významnou funkci v imunitním systému. S primární i sekundární karencí zinku se setkáváme u všech kategorií skotu, malých přežvýkavců i prasat.

Diagnostika karence zinku spočívá v klinických příznacích a ve stanovení koncentrace zinku v krevním séru a v játrech. Snížené hodnoty jsou důkazem karence. Zvýšené hodnoty souvisí se zvýšeným příjmem zinku, ale často jsou způsobeny hemolýzou. Hemolytická séra nelze použít v diagnostice karence zinku.

**Měď** má v organismu mnohostrannou funkci. Je součástí mnoha enzymů a metaloproteinů. Je nezbytná pro tvorbu elastinu a kolagenu, ovlivňuje metabolismus kostí, reprodukční funkce a krevtvorbu. Je významná pro nervovou činnost. Karencí mědi se vyskytuje buď jako primární, nebo častěji jako sekundární. Sekundární karence je způsobena nadbytkem železa, molybdenu a síry. Tyto prvky blokují resorpci mědi.

Diagnostika karence mědi spočívá v klinickém vyšetření (typické změny na srsti kolem očí - takzvané brýle). Rozhodující pro diagnostiku je stanovení koncentrace mědi v krevním séru a játrech. Nepřímo lze karenci mědi diagnostikovat na základě koncentrace ceruloplazminu v krevním séru. Zvýšená koncentrace mědi v krevním séru se vyskytuje při intoxikaci mědí. Zvláště citlivá na intoxikaci mědí jsou jehňata i bahnice.

**Mangan** je zejména jako součást mitochondrií obsažen ve všech buňkách a tkáních organismu. Je důležitý pro růst organismu, vývoj skeletu a reprodukci. Vliv má také na imunitní systém a CNS. Mangan je kofaktorem a aktivátorem řady enzymů, jejichž prostřednictvím se účastní oxidoredukčních procesů tkáňového dýchání. Účastní se tvorby kostí, syntézy glykosaminoglykanů chrupavek, erytropoézy a tvorby hypofyzárních hormonů. Významný je i jeho lipotropní efekt a podíl na syntéze cholesterolu. U přežvýkavců je důležitý také z hlediska růstu a rozmnožování bachorové mikroflóry, s čímž souvisí i tvorba těkavých mastných kyselin a mikrobiálního proteinu. Klinické příznaky karence manganu jsou převážně nespecifické a vyskytují se až při poměrně výrazném deficitu manganu. Mezi příznaky řadíme abnormality v utváření a vývoji skeletu, zejména u mladých jedinců (flexní kontraktury). U jalovic a krav se vyskytují poruchy reprodukce (poruchy ovulace, zhoršené zabřezávání nebo anestrus, aborty) a u samců poruchy testikulární degenerace a zhoršeného

sexuálního libida. Zvýšený příjem manganu je poměrně dobře tolerován, nicméně problém spočívá v omezení absorpce zinku. V případě intoxikace se vyskytují nervové příznaky. Diagnostika karence manganu spočívá v klinickém vyšetření a stanovení obsahu manganu v krmivech, plné krvi a jaterní tkáni.

**Kobalt** je součástí vitamínu B12, jehož prostřednictvím se uplatňuje v řadě biochemických reakcí organismu. Většina kobaltu obsaženého v krvi a tkáních, především v játrech, je ve formě vitamínu B12. Malé množství kobaltu je vázáno na bílkoviny krve. Kobalt je aktivátorem řady enzymů - arginázy, karboanhydrázy, deoxyribonukleázy a dehydrogenáz. U přežvýkavců je důležitým růstovým faktorem bachorové mikroflóry a bachorovou mikroflórou je tvořen vitamín B12. Prostřednictvím vitamínu B12 kobalt ovlivňuje krevtvorbu, zasahuje do metabolismu bílkovin, aminokyselin nukleových kyselin, lipidů a kyseliny propionové. Deficit kobaltu se projevuje především u mláďat poruchami růstu, vznikem mikrocytární hypochromní anemie, hubnutím a chřadnutím zvířat až vznikem kachexie. U dojnic predisponuje vznik ketózy a bachorové indigestce. Diagnostika spočívá ve stanovení koncentrace vitamínu B12 v krvi nebo jaterní tkáni.

**Železo** má v organismu mnohostranné funkce. Většina železa je ve formě komplexních sloučenin vázaných na bílkoviny, jako jsou hemové sloučeniny (hemoglobin, myoglobin), hemové enzymy (cytochromy, cytochromoxidáza, kataláza a peroxidáza), nebo jako nehemové sloučeniny (transferin, feritin a hemosiderin) Železo má klíčovou roli v mnoha biochemických reakcích. Sloučeniny obsahující železo umožňují transport kyslíku a oxidu uhličitého, oxidační a oxidoredukční procesy, přenos elektronů a tvorbu adenosintrifosfátu. Železo je součástí řady enzymů, je důležité pro tvorbu melaninu a dalších pigmentů. Nedostatek železa vede ke vzniku hypochromní mikrocytární anemie. Toto onemocnění se vyskytuje především u selat, telat a kůzlat. Intoxikace železem se nevyskytuje, protože nadbytečně přijaté železo se nevstřebává a vylučuje se výkaly.

Diagnostika karence železa spočívá v příznacích anemie a ve stanovení železa v krevním séru. Dalším vyšetření je stanovení počtu erytrocytů v krvi, koncentrace hemoglobinu a hodnota hematokritu.

**Jod** je základní součástí hormonů štítné žlázy a jejich prostřednictvím zasahuje do metabolismu živočichů. Nedostatek jodu vyvolává sníženou činnost štítné žlázy s řadou negativních dopadů na zdraví, produkci a reprodukci zvířat. V chovech s nedostatkem jodu, nebo v důsledku působení strumigenních látek, které omezují metabolismus štítné žlázy a

využití jodu, lze diagnostikovat vrozené strumy u telat, kůzlat i jehňat. U dojnic vede nedostatek jodu k poruchám činnosti ovarií, k anestrů a k tvorbě ovariálních cyst.

Diagnostika karence jodu spočívá ve stanovení koncentrace jodu v krevním séru, mléku a moči. Při karenci jodu jsou koncentrace jodu v uvedených tekutinách velmi nízké. Pro diagnostiku karence jodu a pro posouzení činnosti štítné žlázy je důležité stanovení hormonů T3, T4 a TSH.

**Tab 11: Referenční hodnoty minerálních prvků u velkých zvířat**

Parametr	Jednotky	SKOT	OVCE	KOZA	PRASE	KŮŇ
Sodík (Na)	mmol/l	136 – 152	139 – 152	142 – 155	135 – 150	132 – 146
Draslík (K)	mmol/l	3,9 – 5,8	3,9 – 5,4	3,5 – 6,7	4,4 – 6,7	3,4 – 4,7
Vápník (Ca)	mmol/l	2,3 – 3,1	2,8 – 3,2	2,2 – 3,0	1,8 – 2,9	2,2 – 3,4
Hořčík (Mg)	mmol/l	0,78 – 1,15	0,85 – 1,15	0,80 – 1,15		0,70 – 1,20
Chloridy (Cl)	mmol/l	90 – 110	90 – 110	90 – 110		95 – 110
Fosfor (P)	mmol/l	1,6 – 2,2	1,6 – 2,6	1,6 – 2,6	1,7 – 3,1	0,9 – 1,6
Zinek (Zn)	μmol/l	12,2 – 18,0	11,0 – 18,0	12,0 – 18,0		
Měď (Cu)	μmol/l	12,6 – 16,0	12,0 – 16,0	12,0 – 16,0		
Železo (Fe)	μmol/l	18 – 30	18 – 30	18 – 30		
Mangan (Mn)	μmol/l	8 – 10				
Selen (Se)	μg/l	80 – 140	80 – 120	80 – 120	min. 100	70 – 100

## 7 Literatura

BC – 2800 Vet: Operation Manual. Shenzhen Mindray Bio-Medical electronics Co. Ltd., Čína, 2005-2007.

Cobas Mira Plus: Operator's Manual. Roche Diagnostic System, Švýcarsko, 1992.

Crha, J.: Bachoroví nálevníci skotu. Katedra fyziologie hospodářských zvířat, Vysoká škola veterinární, Brno, 1980.

Donner, L.: Klinická hematologie. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha, 1985, 448 s.

Doubek, J a kol.: Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. NOVIKO s.r.o., Brno, 2010, 102 s.

Doubek, J. a kol.: Přehled fyziologie II pro VFU Brno. Tribun EU, Brno, 2014, 229 s.

Doubek, J.: Základy laboratorní diagnostiky neinfekčních nemocí. Ústav fyziologie VFU, Brno, 2014, 250 s.

Dubská, L. a kol.: Od fyziologie k medicíně - Laboratorní diagnostika. VFU, Brno, 2010, 85 s.

Dvořák, R.: Fyziologie a patologie trávení přežvýkavců. In: Dvořák, R. a kol.: Výživa skotu z hledisek produkční a preventivní medicíny – sborník referátů odborného semináře Brno. Česká biuatriká společnost, KCHP FVL VFU, Brno, 2005, str. 17-25, ISBN 80-86542-08-4.

Harvey, W. J.: Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animal. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2001, 240 s.

Harvey, W. J.: Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas. Elsevier, St. Louis Missouri, 2012, 360 s.

Hofírek, B. a kol.: Dysfunkce předžaludku (*Dysfunctiones proventriculi*). In: Hofírek, B. a kol.: Nemoci skotu. Česká biuatriká společnost, Brno, 2009, str. 367-405.

Hofírek, B. a kol.: Produkční a preventivní medicína v chovech mléčného skotu. VFU, Brno, 2004, 184 s.

- Hofírek, B. a kol.: Speciální vyšetřovací a diagnostické metody a postupy. In: Hofírek, B. a kol.: Nemoci skotu. Česká biuatriká společnost, Brno, 2009, str. 181-207.
- Illek, J.: Kontrola úrovně výživy skotu pomocí metabolických testů. Krmivářství, roč. V, 2001, (č. 2, str. 12-15).
- Illek, J. a kol.: Využití metabolických testů v kontrole výživy skotu. Krmivářství, roč. VII, 2003, (č. 1, str. 15-16).
- Illek, J.: Závažná průjmová onemocnění telat. Zemědělec: Odborný a stavovský týdeník, roč. XV, 2007, (č. 19, str. 9-12).
- Immulite Automated Immunoassay System: Operator's Manual. Siemens s.r.o., 1997
- Klouda, P.: Moderní analytické metody. Pavel Klouda - Pavko, Ostrava, 2003, 132 s.
- Kvasnička, F.: Uživatelská příručka pro obsluhu izotachoforetického analyzátoru IONOSEP 2002. Recman – laboratorní technika, 2005.
- Liasys: User Manual. AMS – Analyzer Medical System, Itálie, 2002.
- Otyepková, E. a kol.: Základy vybraných experimentálních metod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2013, 97 s.
- Pavlata, L. a kol.: Diagnostika a prevence poruch kolostrální výživy telat. Veterinářství, roč. 55, 2005, (č. 11, str. 689-695).
- Pechová, A. a kol.: Metabolické profilové testy. In: Hofírek, B. a kol.: Nemoci skotu. Česká biuatriká společnost, Brno, 2009, str. 1039-1048.
- Pechová, A. a kol.: Poruchy metabolismu. In: Hofírek, B. a kol.: Nemoci skotu. Česká biuatriká společnost, Brno, 2009, str. 665-713.
- Pechová, A., Pavlata, L.: Využití metabolických profilů při kontrole výživy dojníc. In: Dvořák, R. a kol.: Výživa skotu z hledisek produkční a preventivní medicíny – sborník referátů odborného semináře Brno. Česká biuatriká společnost, KCHP FVL VFU, Brno, 2005, str. 102-111, ISBN 80-86542-08-4.
- Slanina, L. a kol.: Metabolický profil hovädzieho dobytku vo vzťahu k zdraviu a produkcii. ŠVS SR – Ústav veterinárných informácií a osvety, Bratislava, 1992, 115 s.



Vrzgula, L. a kol.: Poruchy látkového metabolizmu hospodárskych zvierat a ich prevencia.  
Príroda, Bratislava, 1982, 492 s.

Autoři:	Mgr. Karolína Pišťková, Lenka Danielová, doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM
Název:	Laboratorní diagnostika u potravinových zvířat – praktická cvičení
Ústav:	Klinická laboratoř pro velká zvířata
Počet stran:	96
Vydání:	20
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

**ISBN 978-80-7305-784-8**



ISBN 978-80-7305-784-8