

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra: Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat
Studijní obor: Všeobecné zemědělství

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**OVĚŘENÍ ÚČINKU VYBRANÝCH REHYDRATAČNÍCH
ROZTOKŮ V SYMPTOMATICKÉ TERAPII PRŮJMŮ TELAT
EXPERIMENTÁLNĚ INFIKOVANÝCH *Cryptosporidium parvum***

Vedoucí práce:
Doc. Ing. Miloslav ŠOCH, CSc.

Autor práce:
Hana LELKOVÁ

2006

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Ověření účinku vybraných rehydratačních roztoků v symptomatické terapii průjmů telat experimentálně infikovaných *Cryptosporidium parvum*“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu literatury.

V Českých budějovicích, dne 15. dubna 2006

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především vedoucímu své diplomové práce, panu Doc. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc. z katedry Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, za pomoc při vypracování této diplomové práce. Veliký dík patří zejména mému školiteli - specialistovi Ing. Pavlovi Kleinovi, PhD. z Výzkumného ústavu živočišné výroby v Praze – Uhřetěvsi za vytvoření podmínek pro experimentální práci a zejména za odborné vedení při řešení úkolu.

1. Úvod	5
2. Cíl práce	5
3. Přehled literatury	6
3.1 Etiologie a patogenese průjmů u telat	6
3.2 Kryptosporidióza	7
3.2.1 Patogeneze a klinický průběh kryptosporidiózy u telat.....	9
3.2.2 Zoohygienická opatření pro tlumení nákazy v chovech skotu	10
3.3 Rehydratační terapie, rehydratační roztoky a vstřebávání iontů a vody v GIT. 11	
3.3.1 Rehydratační terapie	11
3.3.2 Rehydratační roztoky.....	12
3.3.3 Fyziologie vstřebávání iontů a vody v gastrointestinálním traktu.....	14
3.3.4 Absorpce a sekrece elektrolytů.....	15
3.4 Glycerol	16
3.4.1 Biochemie a farmakokinetika glycerolu.....	16
3.4.2 Využití glycerolu v rehydratační terapii.....	17
3.5 Možnosti zjišťování hydratačního stavu.....	18
3.5.1 Extracelulární tekutina a možnosti měření jejího objemu in vivo.....	18
3.5.2 Krevní plazma, krev a možnosti měření jejich objemů in vivo.....	19
3.5.3 Celková voda a možnosti měření jejího objemu in vivo	21
4. Materiál a metody	23
4.1 Podmínky experimentu.....	23
4.2 Experimentální nákaza	24
4.3 Koprologická vyšetření	25
4.4 Rozbory krve	27
4.5 Měření objemu tělních tekutin.....	27
5. Výsledky	30
5.1 Klinický průběh onemocnění	30
5.2 Obsah vody ve výkalech.....	31
5.3 Parametry acidobazické rovnováhy krve v 2. a 6. dnu po infekci (DPI) - graf 3-9:.....	32
5.5 Eliminace markerů z krevní plazmy	35
5.6 Hodnoty vybraných biochemických ukazatelů krevní plazmy telat.....	36
6. Diskuse	37
6.1 Klinický průběh onemocnění	37
6.2 Obsah vody ve výkalech - průběh průjmu.....	37
6.3 Změny acidobazické rovnováhy	38
6.4 Eliminace thiosíranu sodného a antipyrinu z krevní plazmy telat.....	41
6.5 Vliv rehydratačních roztoků na změny objemu tělních tekutin.....	41
7. Závěr	43
8. Seznam použitých zkratk	44
9. Přehled citované literatury	45
10. Příloha	57

1. Úvod

Průjmová onemocnění telat patří stále mezi nejzávažnější zdravotní a ekonomické problémy chovatelů skotu ve všech zemědělsky rozvinutých státech, včetně České republiky. Vzhledem k tomu, že tyto patogeny napadají střevní epitel, dochází v průběhu průjmových onemocnění k narušení rovnováhy mezi vstřebáváním a vylučováním vody a elektrolytů ve střevě. Tyto patologické změny funkce střeva vedou ke ztrátám iontů a vody z organismu a vzniku dehydratace a acidobazických poruch. U nemocných zvířat dochází k poklesu užitkovosti a zvyšují se i náklady na péči o ně, na organizační a zoohygienická opatření aj. Průjmová onemocnění mohou způsobit i přímé ztráty v podobě úhynů. Předpokladem minimalizace těchto ztrát je poskytnutí adekvátní péče nemocným zvířatům. Nezastupitelnou roli v péči o nemocná zvířata pak zastává rehydratační terapie.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo ověřit účinek vybraných rehydratačních roztoků v modelových podmínkách experimentální kryptosporidiózy telat. V kontrolovaných pokusech s celkem 12 telaty experimentálně infikovanými kokcií *Cryptosporidium parvum* bylo cílem práce v období od nakažení do 18 dnů *p.i.* zjistit vliv přídavku glycerolu v rehydratačním roztoku na:

- a) parametry acidobazické rovnováhy
- b) hydratační stav (=objem tělních tekutin)

konzistenci výkalů a klinický průběh experimentální infekce

3. Přehled literatury

3.1 Etiologie a patogeneze průjmů u telat

Průjem jako takový není onemocněním v pravém slova smyslu, ale symptomem celé řady poruch struktury a funkce trávicí trubice. Průjmem (diarrhoea, diarrhea) se označuje častější odchod neformovaných vodnatých výkalů. Celkový objem vyloučených výkalů je přitom zvýšený. Výkaly obsahují 60-90 % vody a již malé změny v obsahu vody vedou ke změnám jejich konzistence. Při 60-70 % obsahu vody jsou formované, při 80-85 % kašovitě a při 90 % a více tekuté (KORBOVÁ *et al*, 1985). Průjem může mít akutní a chronickou formu. Z etiologického hlediska lze průjmy rozdělit na infekční a neinfekční, z hlediska patofyziologického pak na průjmy osmotické a sekreční. Často se vyskytují i průjmy polyetiologického charakteru s uplatněním různých patofyziologických procesů (O'LOUGHLIN *et al*, 1991; BANWELL, 1990).

Pokud jde o telata, toto riziko výskytu polyetiologických průjmů je tím větší, čím je v chovu horší úroveň zoohygieny, výživy a celkové péče o telata (De GRAAF *et al*, 1999). Na celkové nemocnosti telat se průjmová onemocnění spolu s respiračním syndromem podílejí až z 80 % (SLANINA, 1991).

Nejčastější příčinou vzniku průjmů telat jsou podle Roye (1990) enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*. Jako další patogeny jsou uváděny salmonely, rotaviry, koronaviry a kryptosporidie. De Graaf *et al* (1999) uvádějí v sestupném pořadí jako nejdůležitější původce průjmů u telat: enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum*, rotaviry, koronaviry a BVD virus. U telat se z parazitárních infekcí jako první objevuje kryptosporidióza ve věku 10-11 dnů, giardióza kolem 20 dnů po narození a u telat kolem 30 dnů věku jsou nejčastěji zjišťovány kokcidie rodu *Eimeria* a hlístice *Strongyloides* (JURÁŠEK *et al*, 1993).

V patogenezi průjmů mají podle Slaniny (1991) hlavní roli tyto faktory:

1. redukce sekrece slezu
2. zvýšená pasáž střeva
3. redukce střevní absorpční kapacity
4. zvýšená střevní sekrece do střevního lumen

Dále při průjmu dochází ke ztrátám tělních tekutin a následné hemokoncentraci, hypovolémii a hypoxii, ke zvýšeným ztrátám elektrolytů (Na, K, Mg), poruchám acidobazické rovnováhy s tendencí k metabolické acidóze, energetickému deficitu a hypoglykémii, retenci zplodin dusíku a vzestupu hladiny močoviny, nedostatečnému trávení a resorpci mléčné bílkoviny, snížení odolnosti sliznice střeva při nedostatku IgA, rychlé ztrátě tělesné hmotnosti vedoucí až ke kachexii (SLANINA, 1991).

3.2 Kryptosporidióza

Jedním z nejzávažnějších agens, které způsobují průjmy u telat v časně postnatálním období je kokcidie *Cryptosporidium parvum*. *C. parvum* taxonomicky spadá do kmene *Apikomplexa*, třídy *Sporozoea*, podtřídy *Coccidia*, řádu *Eucoccidia*, podřádu *Eimeriina*, čeledi *Cryptosporidiae* a rodu *Cryptosporidium* (LEVINE, 1984). Rod *Cryptosporidium* v současné době zahrnuje ještě dalších 14 druhů lišících se jak morfologickými, tak i jen molekulárně-genetickými znaky a hostitelskou specifitou (THOMPSON, 2003 a, b; XIAO *et al*, 2004).

V nedávné době bylo pomocí molekulárních metod zjištěno, že *Cryptosporidium* se podobá více gregarinám než kokcidiím, proto není překvapující její výskyt v mnoha zvířecích druzích a možnost výskytu i u bezobratlých (HIJJAWI *et al*, 2004). Tato zjištění jsou však zatím dále zkoumána.

Ve srovnání s ostatními kokcidiemi jsou vývojová stádia kryptosporidií druhu *C. parvum* velmi malá. Průměrná velikost oocyst je asi 5 x 4,5 μm a mají tvar elipsoidu až ovoidu. Poprvé popsal přítomnost kryptosporidií v žaludku myši E. Tyzzer v roce 1907 a druh byl pojmenován jako *Cryptosporidium muris*. V roce 1912 byly objeveny ve střevě myši poněkud menší kryptosporidie a byly určeny jako nový druh *C. parvum* (TYZZER, 1912). U telat byl výskyt *C. parvum* zjištěn začátkem sedmdesátých let (PANCIERA *et al*, 1971), později i u jehňat (BARKER *et* CARBONELL, 1974) a kůzlat (TZIPORI, 1983). Dále jsou k onemocnění vnímavá hříbata (SNYDER *et al*, 1978), ale i selata (QUILEZ *et al*, 1996) a krůťata (SLAVIN, 1955).

První výskyt nákazy u telat na území Československa zaznamenal v roce 1979 Pavlásek (PAVLÁSEK, 1981). Od roku 1982 byla kryptosporidióza zjišťována u imunodeficientních lidí, zejména u pacientů s AIDS (O'DONOUGHUE, 1995; FAYER *et al*, 1997). Dále se vyskytly závažné epidemie této infekce v důsledku kontaminace zdrojů

pitné vody. Velké publicity se v této souvislosti dostalo případu, kdy se v roce 1993 v městě Milwaukee ve státě Wisconsin v USA nakazilo kryptosporidiózou více jak 400 000 lidí (Mac KENZIE et al, 1995).

Huetink *et al* (2001) uvádí čtyři možné cesty přenosu oocyst u telat:

1. Z krávy na tele – infekce se přenáší z matky na tele ihned po narození, vyskytuje se ve špatných hygienických podmínkách chovu
2. Z telete na tele
3. Prostřednictvím přenašeče – přenašečem může být např. ošetřovatel, kočky, ale i ptáci
4. Kontaktem s kontaminovaným povrchem, který je rezervoárem oocyst – např. špatně umyté a desinfikované individuální boxy pro telata nebo podestýlka

Vývojový cyklus: *Cryptosporidium parvum* má monoxenní cyklus, který probíhá kompletně v jednom hostiteli. Hostitel se infikuje perorálně - pozře oocysty, které se v tenkém střevě natráví a prasknou (excystují) a uvolní se tak infekční sporozoity, které se usadí v mikrovilózní vrstvě epitelových buněk. Dále se vyvíjí jako trofozoity, které se dělí nepohlavně a vyvíjí se v meronty I. Ty po prasknutí uvolňují merozoity I., které napadají další buňky a znovu probíhá vývoj merontů. Část merozoitů I. se vyvíjí odlišně a formují se v meronty II. typu, z nichž každý obsahuje čtyři merozoity. Po uvolnění z merontu se vyvíjejí v sexuální stádia. Část merozoitů II. proniká do epiteliálních buněk a vyvíjí se v makrogamety a druhá část uvnitř napadených buněk prodělá dělení, přičemž vzniknou mikrogametocyty, které obsahují šestnáct bezbičíkatých mikrogamet. Po uvolnění z mikrogametocytu se mikrogamety spojí s makrogametami a vznikají zygoty. Poté se zygota dělí meiózou a v procesu sporogonie vznikají oocysty se čtyřmi sporozoity. Podstatou vzniku oocysty ze zygoty je mimo jiné tvorba pevné buněčné stěny. Ta se však asi u 20% oocyst nevytváří. Tyto oocysty se nazývají jako tenkostěnné a ještě ve stěně tenkého střeva hostitele se z nich uvolňují sporozoity, které mohou infikovat další epitelové buňky. Zbylá část oocyst, tvořících pevnou buněčnou stěnu, je výkaly uvolňována do prostředí (FAYER *et al*, 1997; GOOKIN *et al*, 2002).

3.2.1 Patogeneze a klinický průběh kryptosporidiózy u telat

Ke kryptosporidióze jsou nejvímavější telata ve věku 1-2 týdny a infekce je u nich lokalizována téměř výhradně v tenkém střevě. Délka prepatentní periody infekce se u telat pohybuje zpravidla od 2 do 6 dnů a délka patentní periody od 4 do 13 dnů. U většiny telat začne 3.-5. den *p.i.* průjem, který trvá 4-17 dnů (De GRAAF *et al*, 1999).

Z výsledků studií, které provedli Holland *et al* (1989,1992) na experimentálně infikovaných telatech je zřejmé, že kryptosporidióza je v GIT telat provázena rozsáhlými morfologickými a následně funkčními změnami, zejména malabsorpcí a kvasnou dyspepsií. Ve vzorcích získaných jejunální biopsií byla zjištěna značná snížení výšky klků, což svědčí o destrukci střevního epitelu (HOLLAND *et al*, 1989). Navíc byly zjištěny vysoké koncentrace vodíku ve vydechovaných plynech infikovaných zvířat, který vzniká mikrobiálním rozkladem nestrávených a neabsorbovaných živin v kaudálních úsecích trávicí trubice. Tato zjištění potvrzují, že průjem u telat v průběhu kryptosporidiózy je v podstatné míře osmotického charakteru a je právě důsledkem malabsorpce živin v destruovaném epitelu. V invadovaném epitelu však dochází i k výrazným změnám v pohybu vody. Pohyb vody je ve zdravé tkáni v rovnováze s absorpcí Na^+ a Cl^- , symportem organických molekul s Na^+ a sekrecí Cl^- . Ztráty enterocytů vedou k atrofii klků a malabsorpci živin a elektrolytů, což posouvá rovnováhu v pohybu vody přes epitel na stranu sekrece (GOOKIN *et al*, 2002). Jak bylo prokázáno u lidí, na vzniku průjmu v průběhu kryptosporidiózy se podílí i zvýšení střevní propustnosti (MOORE *et al*, 1995).

Výsledky studie, kterou provedli Kukuruzovic *et al* (1999) u dětí australských domorodců, potvrzují souvislost mezi výskytem průjmu a změnami střevní propustnosti. Autoři sledovali střevní propustnost u dětí hospitalizovaných s úpornými průjmy provázenými acidózou, hypokalémií, dehydratací a deficitem železa. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u dětí infikovaných kokcidií *Cryptosporidium parvum*. Klein (2002) ve své studii provedené na novorozenech telatech infikovaných kryptosporidiózou uvádí zvýšené hodnoty střevní propustnosti v akutní fázi onemocnění při použití laktulózy / manitolového testu. Současně byla v uvedené studii v akutní fázi infekce zjištěna signifikantně nižší absorpční kapacita pro D-xylózu. Rovněž mírnější průběh glykemické křivky po nakrmení zvířat svědčí pro omezení Na^+ transportních mechanismů, což zjevně

souvisí s nižší absorpční kapacitou infikovaného epitelu pro glukózu. Podobné výsledky zjistili i Argenzio *et al* (1990) na selatech. Další významný ukazatel je malabsorpce bílkovin, kterou můžeme vysvětlit snížením enzymatické aktivity v důsledku redukce absorpční plochy invadovaného epitelu a zrychlenou střevní pasáží. Kromě toho jsou některé aminokyseliny, podobně jako glukóza, absorbovány za účasti Na⁺. Rovněž nižší využitelnost minerálních látek je důsledkem průjmu. Tato zjištění svědčí o negativním vlivu infekce na integritu střevní sliznice a její funkci ochranné bariéry (KLEIN, 2002).

3.2.2 Zoohygienická opatření pro tlumení nákazy v chovech skotu

Morbidita kryptosporidiózy je u mláďat hospodářských zvířat velmi vysoká. Týká se to zejména telat, jehňat, kůzlat a selat. Na farmách s výskytem kryptosporidiózy, kde je možný přenos infekce, onemocní mnohdy 100% všech mláďat, nicméně mortalita je relativně nízká. Riziko přímých ztrát je vyšší v případech výskytu konkurentních infekcí, ale i při nedostatečné péči a výživě (De GRAAF *et al*, 1999). Spolehlivě lze nákazu tlumit pečlivým dodržováním hygienických podmínek, a její následky mírnit správnou výživou mláďat a vhodnou formou symptomatické terapie průjmů. Nejdůležitější je zamezení dehydratace včasným podáním správně sestavených rehydratačních roztoků. Základní pravidla, podle kterých by měli chovatelé postupovat v případě nákazy shrnul Harp *et Goff* (1998): Nemocná telata by měla být ustájena odděleně od zdravých, nejlépe v jiné stáji. Ošetřovatelé by měli nejdříve zaopatřit zdravá telata a potom nemocná, přičemž k nemocným telatům by se měli pokaždé převléknout a přezout. Oblečení musí být neustále obměňováno a ošetřovatelé by se měli pokaždé důkladně umýt. Před naskladněním nově narozených telat by se měly všechny prostory důkladně mechanicky očistit a je nutné použít vhodnou metodu desinfekce.

3.3 Rehydratační terapie, rehydratační roztoky a vstřebávání iontů a vody v GIT

3.3.1 Rehydratační terapie

V kontrole průjmů infekčního původu u telat je uplatňována jak kauzální, tak i symptomatická léčba. Mezi nejdůležitější přístupy v kauzální léčbě patří aplikace vhodných antibiotik a antimikrobiálních léčiv, zvláště pak s antibakteriální, případně antiprotozoální účinností, dle původce infekce, ale také látek s desinfekčním a stabilizujícím účinkem na střevní mikroflóru. Symptomatická léčba je pak zaměřena zejména na potlačení průjmů a zamezení ztrát vody a iontů. Riziko větší ztráty elektrolytů a vody v průběhu průjmu je u telat mimořádně vysoké. Průměrný obsah vody v organismu telete klesá z 87% až na 76%, takže dehydratace může dosáhnout až 10% tělesné hmotnosti (SLANINA, 1991). Průměrné ztráty vody střechem se pohybují kolem 2 litrů za den, ale dosáhnout mohou až 6 litrů denně (NAYLOR, 1999). Toto má za následek celkovou dehydrataci.

Ztráty sodíku u průjmujících telat jsou větší než draslíku. Při osmotickém průjmu se vylučuje 42 mmol/l sodíku a 34 mmol/l draslíku, zatímco u průjmu sekrečního charakteru je to až 78 mmol/l sodíku a 23 mmol/l draslíku (NAYLOR, 1999). Slanina (1991) uvádí, že ztráty elektrolytů (Na, K, HCO₃) ve výkalech stoupají až na čtyřnásobek normální úrovně vylučování. Při akutním průjmu může organismus ztratit za 24 hodin až 2,6 mmol / l / kg ž. hm. K⁺ a 0,33 mmol / l / kg ž.hm. HCO₃⁻. Ztráta Cl⁻ a Mg²⁺ může překročit až čtyřicetnásobek normy. Při chronickém průjmu se vylučuje také velké množství Ca²⁺.

Druhotně se vyskytuje acidóza díky ztrátám hydrogenuhličitanů a anaerobnímu metabolismu glukózy na kyselinu mléčnou, a vzniku dalších organických kyselin v důsledku mikrobiální fermentace malabsorbované tráveniny v kaudálních úsecích trávicího traktu. Důsledkem průjmu je celková slabost, deprese a hypotermie, v některých případech i smrt díky srdeční arytmii. Z hospodářského hlediska je významný nízký přírůstek nebo ztráta hmotnosti, která je způsobena sníženým příjmem mléka a krmiva a malabsorpcí (NAYLOR, 1999).

3.3.2 Rehydratační roztoky

Nejdůležitější místo v symptomatické terapii průjmů, dehydratace a acidózy mají rehydratační roztoky, které organismu telat doplňují vodu, energii a elektrolyty. Rehydratační roztoky také umožňují odpočinek střeva od trávení potravy a podporují tak i rychlejší obnovu poškozeného střevního epitelu. Perorální rehydratační terapie zahrnuje užití roztoků s obsahem elektrolytů při dehydrataci organismu a udržení hydratačního stavu v průběhu průjmových onemocnění (ACRA *et* GHISHAN, 1996).

Orální rehydratační roztoky s obsahem elektrolytů by podle Fayeta (1971) a Phillipse *et al* (1971) měly:

- a) poskytovat dostatek sodíku pro usnadnění rychlého vyrovnání deficitu extracelulární tekutiny
- b) poskytovat molekuly, které usnadňují absorpci sodíku a vody z tenkého střeva jako jsou glukóza, acetát, propionát nebo glycin
- c) poskytovat alkalyzační činidla (acetát, propionát, hydrogenuhličitan), která pomáhají k léčbě metabolické acidózy, často se vykytující u telat trpících průjmy
- d) poskytovat dostatek energie, neboť jsou většinou rehydratační roztoky podávány namísto mléka nebo mléčné krmné směsi

První komerční perorální rehydratační roztok pro léčení průjmujících telat byl vyvinut v Kanadě v šedesátých letech 20. století a byl distribuován pod názvem Ion-Aid. Použití tohoto roztoku přispělo k upřesnění poznatků o vstřebávání elektrolytů, vody a glukózy v tenkém střevě telat. V sedmdesátých letech byly distribuovány nové rehydratační roztoky, již s přídavkem citrátu, díky němuž byla usnadněna absorpce sodíku a alkalizačních činidel, zejména hydrogenuhličitanu, která tlumila acidózu (NAYLOR, 1999). Ze studie, kterou provedli Booth *et* Naylor (1987) na telatech s infekčním průjmem vyplývá, že po podání rehydratačního roztoku s obsahem hydrogenuhličitanu acidóza ustoupila. Zásady péče o telata s průjmovým onemocněním a rehydratační terapie shrnul Naylor (1999):

Důležité je správné zvolení rehydratačního roztoku v závislosti na rozsahu poškození střeva a celkovému stavu telete, protože jen díky správně zvolenému roztoku můžeme rychleji obnovit intenzivní růst telete a zamezíme případné bakteriální invazi přes destruovaný epitel střeva a možné sepsi. Pro zlepšení vstřebávání elektrolytů se do

roztoků přidávají činidla, jako jsou glukóza a aminokyseliny, které podporují absorpci elektrolytů, zejména Na^+ . Pokud je tele v dobré tělesné kondici, vydrží 1-3 dny pouze na rehydratačním roztoku. Telata v horší kondici lze podpořit v malém množství kravským mlékem nebo mléčnou náhražkou, anebo je jim podán vysokoenergetický rehydratační roztok.

Při úporných průjmech se podává pouze rehydratační roztok s obsahem glukózy kolem 120 mmol/l, která poskytuje zhruba 20% energie. Názory na délku podávání roztoku jsou různé, ale v běžné praxi je užíván 1-2 dny. Pokud je hladovění delší než 5 dní, jsou patrné ztráty hmotnosti a oslabení imunity. Výhodou této metody je odpočinek střeva neboť v průběhu průjmu dochází k malabsorpci a maldigesci.

Kombinace rehydratačního roztoku a mléka se využívá při průjmech u telat chovaných ve skupinovém ustájení. Mléko se podává v množstvích kolem 1 litru, neboť ho střevo lépe využije, a v jiném čase než roztok. Pokud je průjem prudký, omezuje se příjem mléka na 2 litry denně. Nejlepším řešením je, když roztok obsahuje acetát, v malém množství hydrogenuhličitan a citrát, neboť takto nezasahuje do srážení mléka.

Vysoce energetické rehydratační roztoky obsahují kolem 400 mmol dextrózy na 1 litr, což zahrnuje dvě třetiny energie mléka. Zabraňují maldigesci tuků a laktózy, která se může vyskytovat u telat trpících průjmy. Těmto roztokům však chybí některé živiny nacházející se v mléce, hlavně bílkoviny, ale poskytují současně elektrolyty a energii, a proto jsou doporučovány pro léčbu telat se špatnou tělesnou kondicí a urputným průjmem. Jsou většinou jediným zdrojem živin a energie. Podávají se 2 litry rehydratačního roztoku 2-3x denně.

Některé roztoky mohou obsahovat přídavek bakterií, především laktobacilů. Ty přeměňují nestravitelnou laktózu na D- nebo L- kyselinu mléčnou. V současnosti se zjišťuje, zda je využití bakterií prospěšné vzhledem ke stavu destruovaného střeva a celkovému zdravotnímu stavu telete.

Naylor (1990) ve své studii považuje za optimální rehydratační roztok o koncentraci sodíku 10 – 20 mmol/l, chloru 40 – 80 mmol/l a metabolizovatelné složky, např. acetátu nebo propionátu (ne hydrogenuhličitanu) 40 – 80 mmol/l a obsahem glukózy, jako energetického zdroje. Michell *et al* (1992) a Brooks *et al* (1996) uvádí vyšší obsah sodíku (120 – 133 mmol/l) v rehydratačním roztoku, který vedl k rapidní korekci extracelulárních elektrolytů a ztrát vody. Pro rychlé vstřebávání sodíku ve střevě je důležitý poměr sodíku ke glukóze. Světová zdravotnická organizace uvádí množství glukózy / Na v poměru <1,4 : 1 (AVERY *et* SNYDER, 1990), nicméně roztoky

s poměrem $\leq 3:1$ jsou také úspěšně používány, jak u lidí (AVERY *et al*, 1990), tak u telat (JONES *et al*, 1984). Hyperosmotické rehydratační roztoky poskytují lepší a rychlejší doplnění chybějících elektrolytů než roztoky isoosmotického charakteru (JONES *et al*, 1984; LEVY *et al*, 1990). Hyperosmotické roztoky minimalizují ztráty hmotnosti v období, kdy tele nemůže dostávat mléko (FETTMAN *et al*, 1986), po požití se rychleji dostávají ze slezu do střeva než roztoky isoosmotické, proto jsou elektrolyty dostupnější a ihned je doplněn jejich nedostatek do organismu. Pro optimální rychlost vyprazdňování roztoku ze slezu se uvádí osmolalita roztoku 400 – 600 mOsm/l (BELL *et al*, 1973).

Roztoky lze podávat orálně nebo intravenózně. Orálně lze podat roztok pomocí lahve s cucákem nebo zavedením jícní sondy (NAYLOR, 1999). Intravenózně se aplikuje vysoce dehydratovaným telatům, které mají díky tomu ochromený sací reflex (GARCIA, 1999).

3.3.3 Fyziologie vstřebávání iontů a vody v gastrointestinálním traktu

Tenké střevo je hlavním místem trávení a vstřebávání živin. Buňky střevní sliznice jsou charakterizovány značnou permeabilitou pro přenos monosacharidů, aminokyselin, monoacylglycerolů, karboxylových kyselin, vody a elektrolytů (SCHENCK *et al*, 1991), malým elektrickým potenciálovým rozdílem a elektrickým odporem. Epitel je tedy schopen resorbovat velké množství vody a solí (KORBOVÁ *et al*, 1985). Sekreční proces je ovlivňován intracelulárními mechanismy. Aktivní sekrece probíhá ve slizničních kryptách, naproti tomu resorpce v klcích (MILLA, 1982). Elektrolyty a voda jsou kontinuálně vylučovány a znovu absorbovány a tím se zapojují do enterosystémových cyklů.

V kraniálních částech tenkého střeva je sekrece vody přibližně stejná jako resorpce, proto je probíhající resorpce nepatrná. V lačníku je resorpce vody podstatně vyšší než sekrece, proto zde nastává zahuštění obsahu střeva (SCHENCK *et al*, 1991). Resorpce vody probíhá současně s aktivní resorpcí elektrolytů pomocí osmotických sil založených na elektrolytickém gradientu (ACRA *et al*, 1996).

Pasivní difúze umožňuje prostup jednotlivých roztoků volně buňkami nebo intercelulárními prostory v obou směrech až do vyrovnání elektrického gradientu (KORBOVÁ *et al*, 1985).

Dále je zapojen aktivní transport elektrolytů do buněk epitelu pomocí přenašečů (DESJEUX *et al*, 1997). Aktivní přenos se děje proti elektrochemickému gradientu a proto vyžaduje energii. Do přenosu jsou zapojeny transportní molekuly, specifické přenašeče bílkovinného charakteru. Glukóza, galaktóza a většina volných aminokyselin jsou resorbovány pomocí přenašeče, který mimo vazebné místo pro přenášenou organickou molekulu má i místo vazby pro sodík. Jsou-li obě místa přenašeče aktivována např. glukózou a sodíkem, uskuteční se transport celého komplexu do buňky. Tento proces probíhá v obou směrech, převážně však ze střevního lumen do cytoplazmy (KORBOVÁ *et al*, 1985; SCHENCK *et KOLB*, 1991). Uvnitř buněk se uvolňuje sodík z komplexu a je aktivně transportován do intersticiálního prostoru $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázovou}$ pumpou umístěnou na bazolaterální membráně enterocytů (ACRA *et GHISHAN*, 1996). Aktivně odtransportovaný iont Na^+ přechází z velké části zpět do lumen střeva, kde může znovu podpořit resorpci glukózy (SCHENCK *et KOLB*, 1991).

Glukóza stimuluje absorpci elektrolytů a tím i absorpci vody (DESJEUX *et al*, 1997). Přenos glukózy se děje pomocí difúze, ale její přenos do krevního oběhu probíhá proti koncentračnímu spádu, tj. aktivním transportem (KORBOVÁ *et al*, 1985).

3.3.4 Absorpce a sekrece elektrolytů

Sodík a chlór

Elektroneutralní absorpce sodíku a chlóru je důsledkem účinku dvou transportérů, měničů $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ a $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ iontů. Vytlačení H^+ z intracelulárního prostoru vede k absorpci Na^+ přes buněčnou stěnu do buňky. Stejným způsobem se dostává do buňky Cl^- a HCO_3^- je vylučován do lumen střeva. Oba děje jsou reverzibilní. Díky těmto procesům se udržuje elektroneutralita a pH ve střevě. Při vzájemné výměně $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ a $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, kdy je sodík a chlór absorbován, vodík a hydrogenuhličitan jsou vylučovány do lumen střeva, kde spolu reagují a tvoří H_2CO_3 . Kyselina uhličitá se dále rozkládá na vodu a na CO_2 , který difunduje do buněk (ACRA *et GHISHAN*, 1996).

Korbová *et al* (1985) uvádí tři typy transcelulární resorpce sodíku a chlóru v tenkém střevě:

1. aktivní resorpce sodíku, která není spojena s přenosem jiných roztoků solí a je provázena pasivní resorpcí chloru

2. resorpce sodíku nastává zároveň s resorpcí některých látek, které nepatří mezi elektrolyty (resorpce některých látek např. D-hexózy, L-aminokyselin, ale i vitaminů nebo žlučových solí závisí na resorpci sodíku)
3. NaCl se může vstřebat z intraluminárního prostoru do krevní plazmy přímo ve formě soli (resorpce NaCl nezávisí na elektrickém potenciálovém rozdílu a usnadňuje proto rychlou resorpci obou iontů epitelovými buňkami).

Draslík

O resorpci draslíku je známo velmi málo. Předpokládá se, že jeho vstřebávání se v tenkém střevě děje pomocí pasivní difúze. Secernován je v tlustém střevě pomocí draselných kanálků.

Další ionty, Ca^{2+} , Mg^{2+} , se resorbují aktivním transportem za přispění příslušných ATP-áz z laterální oblasti enterocytů do kanálků ležících mezi nimi a odtud zpět do tenkého střeva (SCHENCK *et* KOLB, 1991).

3.4 Glycerol

3.4.1 Biochemie a farmakokinetika glycerolu

Glycerol (1,2,3-propantriol) je alkohol, jenž obsahuje tři uhlíky, na které se vážou tři hydroxylové skupiny. Je produkován organismem v koncentraci nepřesahující 0,1 mmol/l. Glycerol vzniká za katalýzy enzymem glycerol-kinázou z glycerol-3-fosfátu. Glycerol-3-fosfát může vznikat z dihydroxyacetonfosfátu pomocí glycerolfosfát dehydrogenázy nebo z dihydroxyacetonu pomocí glycerol dehydrogenázy. Obě tyto reakce jsou reverzibilní. Enzymy katalyzující metabolismus glycerolu jsou tkáňově specifické. V játrech a ledvinách můžeme zjistit přítomnost jak glycerol kinázy, tak glycerol dehydrogenázy. Malá množství těchto enzymů se vyskytují i v kosterním svalstvu a střevní sliznici. Glycerolfosfát dehydrogenáza se vyskytuje v kosterním svalstvu, játrech a tukové tkáni. Glycerol může vznikat i de-esterifikací triacylglycerolů v tukové tkáni, svalech, játrech a cirkulaci krve v cévách lemovaných lipoprotein lipázou. Deesterifikace triacylglycerolů v tukové tkáni a v krevních cévách zahrnuje větší podíl cirkulace glycerolu v organismu. Žilní infuze a požití koncentrovaného roztoku

glycerolu, zvyšuje rapidně obsah glycerolu v krvi a osmolalitu, stoupne i jeho exkrece v moči (ROBERGS *et* GRIFFIN, 1998).

Pelkonen *et al* (1967) uvádí ve své studii provedené na lidech, že již malé dávky koncentrovaného roztoku glycerolu (0,07g/kg ž.hm.resp. 50g/l) vedly ke značnému zvýšení obsahu glycerolu v krvi (3,8 mmol/l) během 15 minut po požití. Vysoká dávka roztoku glycerolu, použitá ve studii Sommera *et al* (1993) (1,2g/kg ž.hm. resp. 850g/l), zapříčinila abnormální vzestup koncentrace glycerolu v krvi až na 7,5 mmol/l během 15 minut a maxima 19,3 mmol/l dosáhla v 75 minutě po požití.

Požití glycerolu nevyvolává většinou negativní změny v zažívání (FRANK *et al*, 1981; TOURTELLOTE *et al*, 1972). Ve studii, kterou provedl Gleeson *et al* (1986) na lidech, si dobrovolníci stěžovali na lehkou bolest hlavy, nadýmání a nevolnost. Množství glycerolu v podaném roztoku bylo 1275 mOsmol/kg. Podobné obtíže se vyskytly i u lidí ve studii Lyonse *et al* (1990).

3.4.2 Využití glycerolu v rehydratační terapii

Glycerol patří mezi nejúčinnější rehydratační činidla. Riedesel *et al* (1987) jako první potvrdil, že glycerol obsažený v hydratačních roztocích přispívá ke zvýšení obsahu vody v organismu. Stejných výsledků dosáhli ve svých studiích Latzka *et al* (1997), Monter *et al* (1996) a Freund *et al* (1995). Efektivita jeho využití však byla testována téměř výhradně ve sportovní medicíně (SCHEETT *et al*, 2001). Glycerol je hyperhydratační činidlo: přes vodíkové můstky obsažené v jeho molekule může poutat až tři molekuly vody a udržovat tak obsah celkové vody v těle, čímž přispívá ke snížení rektální teploty a srdeční frekvence, ovlivňuje vylučování močoviny a vzestup hladiny cukrů (LYONS *et al*, 1990, ROBERGS *et* GRIFFIN, 1998). Proto je součástí rehydratačních roztoků např. pro maratónské běžce nebo cyklisty. Zapojuje se přímo do energetického metabolismu a přebytek se vylučuje prostřednictvím jater a ledvinových tubulů. Předpokládá se, že rehydratační roztoky s přídavkem glycerolu podporují rychlejší a kompletnější obnovu množství vody v těle po akutní dehydrataci než roztoky bez glycerolu (SCHEETT, 2001).

Intravenózní příjem glycerolu však není, podle Robergse *et* Griffina (1998), organismem tolerován a je provázen hemolýzou, hemoglobinúrií a zvýšeným rizikem poškození ledvin.

Dle našich poznatků nebyl glycerol použit jako součást rehydratačních roztoků pro pacienty trpící průjmami.

3.5 Možnosti zjišťování hydratačního stavu

Voda je nejrozšířenější součástí savčího těla a jednou z esenciálních součástí diety. Celkový obsah vody v těle můžeme rozdělit do dvou složek (HIX *et al*, 1959):

- extracelulární voda (30%)
- intracelulární voda (26,2%)

Extracelulární voda zahrnuje vodu obsaženou v krevní plazmě (5,8%), intersticiální vodu (24,2%), která vyplňuje prostory okolo buněk a spojuje tkáně. Zbylých 43,8% těla připadá na tzv. suchý podíl, tj. 22,6% zaujímá tuk a zbylých 21,2% připadá na bílkoviny a minerály.

Fayet (1968) rozděluje ve své studii provedené na telatech vodu v organismu na celkovou vodu, která představuje $73,3 \pm 3,5$ %, extracelulární $44,3 \pm 4,6$ %, intracelulární $29 \pm 5,1$ %, objem plazmy $6,8 \pm 0,5$ % a objem krve $10,3 \pm 1$ %.

Důsledkem dehydratace jsou především změny v objemu krevní plazmy, krve a extracelulární tekutiny. Znalosti o množství krevní plazmy a extracelulární tekutiny jsou tedy nepostradatelné pro přesný kvantitativní odhad deficitu tekutin během dehydratace, stejně tak, jako pro správné zvolení léčby dehydratace.

3.5.1 Extracelulární tekutina a možnosti měření jejího objemu *in vivo*

Vzhledem k tělesné hmotnosti má odpovídající vztah vzestup extracelulární tekutiny. Toto zjištění bylo popsáno na mnoha zvířecích druzích včetně člověka (KAMI *et al*, 1984; FELLERS *et al*, 1949). Pro měření objemu extracelulární tekutiny se využívá dilučních metod za použití vhodných markerů. Spensley *et al* (1987) a Kami *et al* (1984) použili ve svých studiích na hřibatech a Hix *et al* (1959) v práci na ovčích thiokyanát sodný. Dalším markerem může být inulin (KOWALSKI *et al*, 1952) a dále thiosíran sodný jehož použití dokumentují ve svých studiích na ovčích English (1966) a Ternouth

(1968), a který je v současnosti velmi využívaným markerem pro měření objemu extracelulární tekutiny.

Měření distribučního prostoru thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) je uvedeno v mnoha studiích na různých zvířecích druzích. Newman *et al* (1946) našli metodu pro přesné měření thiosíranu v plazmě a moči, zatímco Gilman *et al* (1946) obhájili jeho použití pro měření extracelulární tekutiny. Značné množství studií provedených na psech a lidech dokazuje, že měření pomocí thiosíranu sodného je srovnatelné s výsledky, které poskytují měření s použitím inulinu (KOWALSKI *et al*, 1952; RAISZ *et al*, 1953; IKKOS, 1955; MULROW *et al*, 1956). English (1966) uvádí u beranů průměrné hodnoty distribučního prostoru thiosíranu $14,9 \pm 1,48$ % z živé hmotnosti, u bahnic $15,5 \pm 1,63$ % a u jehňat $19,7 \pm 2,20$ % (vysoké rozmezí hodnot distribučního prostoru thiosíranu u jehňat se vysvětluje nízkým podílem tělního tuku a nerozvinutou bachorovou činností). Tyto hodnoty nebyly o mnoho nižší než hodnoty uváděné ve studiích Elkintona *et Danowskiho* (1955), resp. Levitta *et Gaudina* (1950), kteří uvádí průměrné hodnoty pro distribuční prostor inulinu 16 % u lidí resp. 19,4 % u psů.

Thiosíran sodný byl shledán jako nestabilní v krevní plazmě a kyselých roztocích (ROSS *et al*, 1992), proto se analýzy musí dělat do 12 hodin po odběru vzorků nebo je lze ihned zamrazit. Cardozo *et Edelman* (1952) zjistili na psech a lidech, že se thiosíran smísí s krví během 10-12 min. po intravenózní aplikaci. První clearance se objevuje u skotu již po 10-ti minutách (DALTON, 1961). Ross *et al* (1992) zjistili první clearance z krevní plazmy býků během 15-20 min. V krevní plazmě lze thiosíran stanovit kolorimetricky.

3.5.2 Krevní plazma, krev a možnosti měření jejich objemů *in vivo*

Změny v objemu krevní plazmy jsou dynamické a jsou výsledkem redistribuce vody mezi intracelulárními a extracelulárními kompartmenty, a zároveň jsou závislé na obsahu vody ve střevě (Mc MURRAY *et al*, 1978). Pro měření objemu krve a krevní plazmy se z dilučních metod používá bromsulfoftalein nebo erytrocyty označené fosforem-32 (P^{32}). Dalším vhodným markerem je Evansova modř (T-1824; $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$).

U ovcí použili Evansovu modř ke zjištění objemu krevní plazmy Kennedy *et Millikan* (1938) a Barcroft *et al* (1939) sledovali s jejím využitím změny objemu plazmy u březích bahnic. Schambye (1952) (cit. English, 1966) srovnával hodnoty objemů

plazmy u ovcí, které získali za použití Evansovy modři a dále enterocytů označených P³². Další měření množství krve a krevní plazmy za pomoci Evansovy modři uskutečnili např. Persson *et Ullberg* (1979) na mladých hříbatech nebo Quigley *et al* (1997) na telatech. Pozitivní korelace mezi tělesnou hmotností a objemem krevní plazmy resp. krve byly zjištěny ve studii Spensleyho *et al* (1987).

Evansova modř je netoxické nepyrogenní barvivo chemicky spadající mezi diazoniové soli. Tvoří pevný komplex s plazmatickými bílkovinami, zejména albuminem (DALTON *et FISHER*, 1961; GREGERSEN *et RAWSON*, 1942). První použití barviva pro měření krve resp. krevní plazmy je popsáno ve studii Gregersena *et al* (1935). Evansovu modř lze proto aplikovat intravenózně a tak ji dobře využít pro měření objemu krve a krevní plazmy *in vivo*, neboť její distribuční prostor odpovídá dosti přesně objemu krevní plazmy. Její koncentraci lze v odstředěné plazmě zjistit poměrně snadno spektrofotometricky (FOLDAGER *et BLOMQUIST*, 1991).

Malé množství barviva může být zjištěno ve žluči a tkáňových fagocytech, ale hlavně se vyskytuje v extra cévních buňkách a lymfatickém systému. Evansova modř nemůže prostoupit do mozkomíšního moku nebo přes placentu. Vylučování barviva z krve resp. krevní plazmy je poměrně pomalý proces (DAWSON *et al*, 1920). Krev se smísí s barvivem během 10-15 minut po intravenózní aplikaci. Podle některých autorů můžou ztráty Evansovy modři z cévního oběhu během 10-ti minut po i.v. aplikaci ovlivnit odhad objemu krevní plazmy (MACKIE, 1976; MÖLLENBERG *et al*, 1975; PAYNE *et al*, 1967). Payne *et al* (1967) uvádí, že ztráty Evansovy modři z cévního oběhu u skotu byly rozdílné od ztrát u lidí nebo psů. Tato zjištění předpokládají mezidruhové rozdíly v cévní propustnosti a zdají se být významnou součástí v určování objemu krevní plazmy a krve. Payne *et al* (1967) se ve své studii domnívá, že ztráty Evansovy modři z plazmy jsou zapříčiněny únikem albuminu a barviva na něm navázaného do extracévního prostoru. Věk zvířete může mít také vliv na množství ztrát Evansovy modři z oběhu; mladší jedinci vylučují barvivo rychleji než starší zvířata (THORNTON *et ENGLISH*, 1978). Podobně je tomu ve studii, kterou provedli Peerson *et Ullberg* (1979) na hříbatech a dospělých koních, kdy popisují rychlejší úbytek barviva z cévního oběhu hříbat, než tomu bylo u koní dospělých.

3.5.3 Celková voda a možnosti měření jejího objemu *in vivo*

Akutní enteritidy provázené průjmy vedou ke snížení objemu celkové vody v těle (DALTON, 1964b). Obecně je známo, že obsah celkové vody v těle je u mláďat podstatně vyšší než u dospělých jedinců. Dokládá to i Spensley *et al* (1987) ve své studii provedené na hříbatech. Kvantitativním určením celkové vody v těle za použití tritiové vody (THO) bylo zjištěno, že voda v savčím těle je velmi variabilním komponentem (PACE *et* RATHBUN, 1945). Pro zjištění celkového obsahu vody v těle telat použili tritium ve svých studiích např. také Thorton *et* English (1978) a Fayet (1971). Nepřímou souvislost mezi obsahem tělního tuku a objemem celkové vody za pomoci diluční metody zjišťovali ve svých studiích na lidech Brodie *et al* (1949), na skotu Kraybill *et al* (1951) a na prasatech Kraybill *et al* (1953). Tyto studie odhalily přesnost a aplikaci dilučních metod pro zjišťování obsahu vody a jiných tělesných komponentů v těle. Brodie *et al* (1949) uvádí jako první použití antipyrinu v *in vivo* studii jako markeru pro zjištění celkového obsahu vody v těle. Stejného markeru použil ve své studii u ovcí i Hix *et al* (1959).

Předpokladem pro využití antipyrinu (1,5-dimethyl-2-phenyl-3-pyrazolonu) pro měření celkového objemu vody je jeho schopnost difundovat rovnoměrně do vody v těle (BRODIE *et al*, 1949). Ačkoliv se zdálo, že se antipyrin váže na plazmatické bílkoviny (SOBERMAN *et al*, 1949), nakonec se ukázalo, že tomu tak není (MENDELSON *et* LEVIN, 1959). Antipyrin byl shledán jako vhodný marker pro měření objemu celkové vody v těle jak u lidí, tak i u zvířat (ENGLISH, 1966). Objemy získané pomocí antipyrinu byly v souladu s výsledky získanými měření pomocí „těžké vody“-oxidem deuteria (D₂O) (BRODIE *et al*, 1949) a zároveň s výsledky studie Prentice *et al* (1952), kteří provedli měření pomocí tritiové vody (THO). Použitím THO vyšly ve studii Tilla *et* Downese (1962) průměrné hodnoty celkového obsahu vody u ovcí 62 % z živé hmotnosti (48 – 78 %), podobně Morris *et al* (1962) uvádí ve studii hodnoty od 56 do 66 % z živé hmotnosti. Měření objemu celkové vody v těle pomocí antipyrinu bylo provedeno na mnoha zvířecích druzích (ENGLISH, 1966). U telat lze tedy měřit objem celkové vody pomocí distribučního prostoru antipyrinu v krevní plazmě (THORNTON *et* ENGLISH, 1978). Kraybill *et al* (1951) zjistil na telatech, že se antipyrin po dvou hodinách rovnoměrně rozšířil do vody v těle a jeho koncentrace ve tkáních byla úměrná koncentraci tkáňové vody; v této studii byla srovnávána plazma, játra, slinivka, srdce a příčně pruhovaná svalovina. Na rozdíl od těchto zjištění Dumont (1955), Graff *et* Young

(1955) (cit. English, 1966) ve studiích na ovcích dokázali, že distribuční prostor antipyrinu nezobrazuje přesný objem celkové vody. Dumont (1955) pozoroval změny v koncentracích antipyrinu v různých tkáňových tekutinách u ovcí. Zjistil, že antipyrin nedosáhl zároveň stejných koncentrací v tkáňové vodě a vodě obsažené v krevní plazmě. Objevil také, že se z většiny orgánů, kromě svalů, vylučuje antipyrin nerovnoměrně. Graff *et* Young (1955) zase zjistili extrémně variabilní hodnoty celkové vody v těle u jehňat (ENGLISH, 1966).

V našem pokusu jsme pro měření objemu tělních tekutin zvolili jako markery thiosíran sodný (TS), antipyrin (AP) a Evansovu modř (EM).

4. Materiál a metody

4.1 Podmínky experimentu

Zvířata: Do pokusu bylo zařazeno 12 novorozených býčků holštýnského plemene ve věku 3 dny (\pm 36 hodin). Telata byla ihned po narození izolována od ostatních zvířat, napojena mlezivem a převezena do experimentální stáje VÚŽV v Uhřetěvsi. Zvířata pocházela z chovu ZD Brtnice u Jihlavy. Telata zařazená do pokusu byla klinicky zdravá a prostá příznaků střevní infekce.

Ustájení: Pokusy se uskutečnily v experimentální stáji VÚŽV, v oddělené sekci pro telata. Telata byla ustájena individuálně v omyvatelných polypropylenových koticích na betonové podlaze. Slámová podestýlka se každodenně vyměňovala.

Dieta: Všechna telata přijímala 3 dny po narození mlezivo (2,5 litru 2x denně). První mlezivo pocházelo od vlastní matky, další bylo směsné ze zmrazených zásob. Postupně byla telata převáděna na MKS (Telasan-AA, Bodit, Tachov, ČR). Směs byla ředěna teplou vodou v poměru doporučeném výrobcem (1 : 9). Voda byla k dispozici *ad libitum*.

Od 4,5 do 7 dne *p.i.*, tedy v době vrcholení symptomů onemocnění, telata namísto krmiva přijímala rehydratační roztoky v uvedeném složení.

Tab.1: Složení rehydratačního roztoku (g / l)

glukóza	62,2
NaCl	3,2
KCl	1,5
NaHCO ₃	2,5
Glutamin	11,7
Citronan sodný	4,4

Pokusná skupina měla rehydratační roztok obohacený o glycerin v množství 1 g / kg ž. hm.

Hygienická opatření: V průběhu infekčních pokusů byla dodržována mimořádná hygienická opatření. Vstup do stáje byl možný pouze přes desinfekční rohož s desinfekčním médiem chloraminem. V budově byla vyhrazena šatna pro ošetřující personál, který měl ke zvířatům přístup v čistém oblečení a omyvatelné obuvi. K desinfekci povrchů ve stáji a k průběžné desinfekci náradí a kbelíků byl používán 7% roztok peroxidu vodíku. Desinfekce veškerých povrchů ve stáji peroxidem vodíku byla prováděna každé 4 dny. Pro ošetření stěn kotců a kbelíků byl používán 1% roztok Ajatinu. V průběhu pokusu byla v nočních hodinách v přípravně v provozu germicidní UV lampa. Personál používal při práci s výkaly latexové rukavice, k mytí bylo k dispozici desinfekční mýdlo.

Pilotní pokus: Vlastním infekčním experimentům předcházela pilotní pokus se dvěma telaty, na kterých byla provedena pasáž kultury kryptosporidií a zároveň byla odzkoušena metodika měření objemu tělních tekutin dilučními metodami a metoda zjišťování parametrů acidobazické rovnováhy organismu.

4.2 Experimentální nákaza

K experimentální nákaze byly použity čerstvé oocysty *Cryptosporidium parvum*, bovinního izolátu VUZV-N izolované z výkalů nakaženého telete z pilotního pokusu. Oocysty byly získány v 8. dnu *p.i.* klystýrem za použití fyziologického roztoku o tělesné teplotě.

Purifikace oocyst: Čerstvý materiál získaný výplachem byl protřepáním smíchán s podchlazeným petroléterem v poměru 1 : 4. Suspenze byla rozlita do širokých 100 ml zkumavek a odstředěna 20 minut v centrifuze (MPW-360, Polsko) při 1500 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován puřem (PBS) a opět odstředěn. Promývací proces byl opakován 2x. Sediment byl resuspendován v malém množství PBS a doplněn chlornanem sodným na výslednou koncentraci 1%. Suspenze byla uložena 20 min. při 4°C. Poté byla suspenze promyta PBS a odstředěna 20 min. Promytí bylo opakováno 3x. Oocysty byly poté izolovány na gradientu ze Sheaterova roztoku (AARWOOD *et* STERLING, 1987): ze Sheaterova roztoku (500 g sacharózy; 6,5 g fenolu; 320 ml deionizované vody) a PBS-tween (500µl Tween-20 doplněno na 1000 ml

PBS) byly připraveny roztoky v poměru 1:2 a 1:4. V tomto pořadí byly navrstveny do širokých 100 ml zkumavek v množství 30 + 30 ml tak, aby zůstalo zachováno koncentrační rozhraní mezi vrstvami. Třetí vrstva (15 ml) byla suspenze oocyst v pufru. Izolace proběhla odstředěním (1500 g, 30 min.) za použití stejné centrifugy. Supernatant byl odsát a obsah vrstvy s oocystami (mezi koncentračními rozhraními 1 : 2 a 1 : 4) převeden Pasteurovou pipetou do lahvičky a resuspendován pufrem a dále 30-ti min. odstředěním promyt od zbytků Sheaterova roztoku v širokých 100 ml zkumavkách. Promytí proběhlo 2x. Sediment byl převrstven 2,5% vodným roztokem dichromanu draselného (Lachema, ČR) a do použití byla kultura uložena při 4°C. Bezprostředně před použitím byla suspenze krátce odstředěna (10 min.), supernatant odstraněn a oocysty odstředěním 3x promyty PBS a zbaveny K₂Cr₂O₇. Telata byla infikována množstvím 10⁷ oocyst, perorálně injekční stříkačkou před večerním kmením.

4.3 Koprologická vyšetření

Intenzita průjmu byla hodnocena jako procentuální podíl vody ve výkalech. Z ranního odběru výkalů bylo odebráno vždy 3-5 g výkalů a vzorek byl okamžitě zpracován nebo do analýzy zamražen na -26°C. Obsah sušiny byl zjišťován vázkově po vysušení vzorku při 103°C.

Vzorec pro výpočet intenzity průjmu (%) – podíl vody ve výkalech:

$$\text{IP (\%)} = \left[100 - \frac{\text{hmotnost sušiny}}{\text{hmotnost vzorku před vysušením}} \right] * 100$$

K parazitologickým analýzám byly vzorky odebírány z rekta 2x denně, vždy v ranních a večerních hodinách. 50-80 mg vzorku bylo přeneseno do 5 ml zkumavky a doplněno deionizovanou vodou na 1 ml. Vzorek byl zhomogenizován na třepačce a doplněn 2 ml podchlazeného petrolétheru a opět protřepán. Zkumavka byla doplněna do 4 ml deionizovanou vodou a vložena do chlazené centrifugy (1500 g, 4°C;) na 10 minut a po odstředění byl odsát supernatant. Tímto byly odstraněny tuky obsažené ve výkalech. Sediment byl doplněn vodou, aby výsledný objem ve zkumavce byl 1 ml. Po důkladném promíchání na třepačce bylo mikropipetou kápnuto 40 µl suspenze na podložní sklo a kapka špičkou mikropipety rozetřena od středu ke kraji do skvrny tvaru elipsy o velikosti cca 2 x 3 cm. Vzorek byl vyšetřen na přítomnost oocyst modifikovanou metodou dle Henriksena *et* Pohlenze (1981): Po zaschnutí preparátu byla skvrna fixována metanolem v plameni a sklíčko ponořeno na 10 min. do roztoku karbol-fuchsinu dle Ziehl-Neelsena (Fluka, ČR). Po opláchnutí vodou byl preparát odbarven 3% roztokem HCl v 95% denaturovaném etanolu po dobu 20-80 sekund. Preparát byl znovu opláchnut vodou a ponořen na 30-50 sekund do 1% roztoku metylénové modři (Lachema, ČR) pro dobarvení pozadí. Po opláchnutí vodou a oschnutí byl preparát překryt krycím sklíčkem na kapce imerzního oleje (Fluka, ČR) a byl hodnocen mikroskopicky v polychromatickém osvětlení bez použití filtru při 250x nebo v imerzi při 630x zvětšení (mikroskop Jenalumar, Carl Weiss, Jena, SRN). Oocysty barvené touto metodou byly na modrém pozadí viditelné jako karmínově rudé, kulovité až oválné útvary s patrnými sporozoity. V případě že distribuce oocyst na sklíčku byla rovnoměrná, byly při 250 x zvětšení spočteny oocysty v 10 náhodně vybraných zorných polích (ZP) a vypočítán aritmetický průměr. Při nerovnoměrné distribuci nebo nízké koncentraci oocyst byly spočítány obsahy až 50 ZP. Intenzita infekce byla při uvedeném zpracování vzorků hodnocena semi-kvantitativně podle 4-bodové stupnice:

- +...sporadický nález (< 1 oocysta / ZP)
- ++...slabá infekce (2-8 oocyst / ZP)
- +++...silná infekce (9-25 oocyst / ZP)
- ++++...velmi silná infekce (> 25 oocyst / ZP)

4.4 Rozbory krve

V 9. dnu *p.i.*, po ukončení podávání rehydratačních roztoků, byl proveden biochemický a hematologický rozbor krve. Ve 2. a 6.dnu *p.i.* byly v krvi zjištěny parametry acidobazické rovnováhy a v 6. dnu *p.i.*, tedy uprostřed periody podávání rehydratačních roztoků za použití markerových metod (EM, AP, TS) bylo provedeno měření objemu tělních tekutin.

Vzorky krve na vyšetření parametrů acido-bazické rovnováhy byly odebrány vždy před ranním krmením z *v. jugularis*, převedeny do tenkých heparinizovaných kapilár, uloženy do chladicího boxu na ledovou tříšť a ihned odvezeny k analýze dle Astrupa (Coulter MaxM, Coulter corporation, USA).

Vzorky krve pro zjištění biochemických a hematologických rozborů byly odebrány vždy v ranních hodinách před krmením. Z *v. jugularis* bylo odebráno 5 ml krve, převedeno do heparinizovaných zkumavek a odvezeno k vyšetřením (Coulter MaxM, Coulter corporation, USA; Hitachi 704, Boehringer, SRN; Ciba-Corning, Bayer, SRN).

4.5 Měření objemu tělních tekutin

Vlastní měření objemu celkové vody v těle, extracelulární tekutiny a krve resp. krevní plazmy bylo uskutečněno vždy 3. den od zahájení rehydratační terapie, v ranních hodinách. Pro měření objemu tělních tekutin byly telatům intravenózně do *v. jugularis* aplikovány 2 ml sterilního 5% roztoku (w/v) Evansovy modři, 20 ml 25% roztoku (w/v) thiosíranu sodného a 10 ml 40% roztoku (w/v) antipyrinu. Měření bylo zahájeno vždy 10 minut po přijetí odměřené dávky rehydratačního roztoku. Po aplikaci roztoků TS, AP a EM byly telatům v pravidelných intervalech 10, 20, 30, 60, 120, 180 a 240 minut odebrány vzorky krve, přeneseny do 5 ml heparinizovaných zkumavek a odstředěny 20 minut při 1500 g a 4°C. Plazma byla přenesena do mikrozkušavek eppendorf a vzorky byly do analýzy zamrazeny na -26°C. Koncentrace barviva byla zjištěna v odstředěné plazmě. Současně byl z každého odběru odebrán i vzorek krve pro stanovení hematokritu. Vzorky pro zjištění hematokritu byly analyzovány na přístroji Coulter MaxM (Coulter corporation, USA).

Pro stanovení markerů v krevní plazmě byly zvoleny spektrofotometrické metody.

4.5.1 Stanovení thiosíranu sodného (ROSS *et al*, 1992)

500 μ l vzorku / standardu bylo deproteinováno 2 ml 8% kys.trichloroctové, vzorek byl důkladně protřepán na vortexu a 15 minut odstředěn (1500g / 4°C). K 1 ml supernatantu bylo přidáno 500 μ l 8% roztoku Na₃PO₄ a 500 μ l jodového činidla (0,0005 M I₂ v 1 litru 1 M roztoku KI), roztok byl promíchán a ponechán 30 minut při laboratorní teplotě reagovat. Poté byly k roztoku přidány 2 ml H₂O. Absorbance byla změřena při λ = 350 nm proti slepému vzorku (spektrofotometr Libra S22). Slepé vzorky i standardní roztoky byly připraveny stejným způsobem, včetně deproteinace kyselinou trichloroctovou.

4.5.2 Stanovení antipyrinu (GREENBLATT *et* LOCNISKAR, 1979)

K 1 ml plazmy bylo přidáno 1 ml H₂O a 1 ml zinečnatého činidla (100 g ZnSO₄ * 7 H₂O + 40 ml 3 M H₂SO₄ doplněno do 1 l destil. vodou). Za stálého míchání bylo k této směsi po kapkách přidáváno 1 ml 0,75 M NaOH a vzorek byl poté ponechán 10 minut stát a pak 15 minut odstředěn (1500g / 4°C). 1,5 ml supernatantu bylo odebráno a zředěno vodou 1 : 1, poté bylo přidáno 20 μ l 2 M H₂SO₄ a změřena absorbance při 350 nm. Kyvety byly ponechány v karuselu spektrofotometru a ke každému vzorku bylo přidáno 40 μ l 0,2% NaOH₂. Přesně po 20 minutách se znovu změřila absorbance při 350 nm. Koncentrace antipyrinu ve vzorku byla zjištěna z rozdílu absorbancí před a po přidání NaNO₂.

4.5.3 Stanovení Evansovy modři (FOLDAGER *et* BLOMQUIST, 1991)

Pro stanovení koncentrace barviva v krevní plazmě byla zvolena nejpřesnější metoda podle Foldagera *et* Blomqvista (1991), kdy je vzorek odstředěné plazmy proměřován spektrofotometricky při vlnové délce 620 nm, při které je maximální absorbce EM a dále při vlnové délce 740 nm, kdy je zjišťována absorbance zákalu, který měření při 620 nm částečně ruší.

Vzorky plazmy byly před vlastním stanovením ředěny 1: 0,5 fyziologickým roztokem a krátce odstředěny (1500g / 4°C) Vlastnímu stanovení předcházely analýzy 8

vzorků plazem odebraných telatům stejného věku. Všechny vzorky byly negativní na přítomnost EM. Hodnoty absorbance při 740 nm byly vyneseny v grafu na osu x, hodnoty absorbance při 680 na osu y a byla vypočtena regrese:

$$y = 0,7784x + 0,153$$

kde:

y = absorbance "čisté" plazmy při $\lambda = 620$ nm = hodnota korekčního faktoru pro výpočet korigované hodnoty

x = hodnota absorbance "čisté" plazmy při $\lambda = 740$ nm

Hodnota absorbance reálných vzorků s obsahem EM byla potom korigována uvedenou regresní rovnicí podle hodnot absorbancí zjištěných pro každý vzorek při obou vlnových délkách. Koncentrace EM byla zjištěna z kalibrační přímky. Kalibrační křivka byla sestavena ze standardů o koncentracích 0,032; 0,016; 0,008; 0,004; 0,002; 0,001; 0,0005 mg EM /ml. Barvivo bylo připraveno do 20% plazmy. V uvedeném koncentračním rozhraní byla u $\lambda = 620$ nm dodržena platnost Lambert - Beerova zákona a kalibrační křivka měla lineární průběh.

Objem plazmy (V_p) byla vypočtena podle rovnice:

$$V_p = \frac{Q}{c_{EM}}$$

kde: c_{EM} ... koncentrace Evansovy modři v plazmě (mg/l)

Q ... množství Evansovy modři intravenózně aplikované (mg)

Objem krve (V_k) byl vypočten podle rovnice:

$$V_k = V_p \cdot \frac{1}{1 - H}$$

kde: H ... hodnota hematokritu

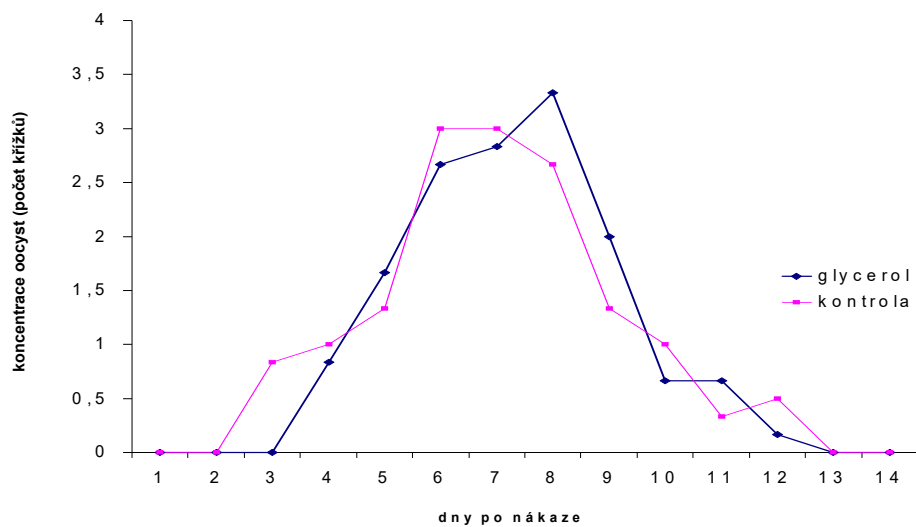
5. Výsledky

5.1 Klinický průběh onemocnění

tab.2: Koncentrace oocyst ve výkalech infikovaných telat (počet křížků vyjadřuje ve 4-bodové stupnici koncentraci oocyst, číslo v závorce udává průměrný počet oocyst v zorném poli při 250x zvětšení)

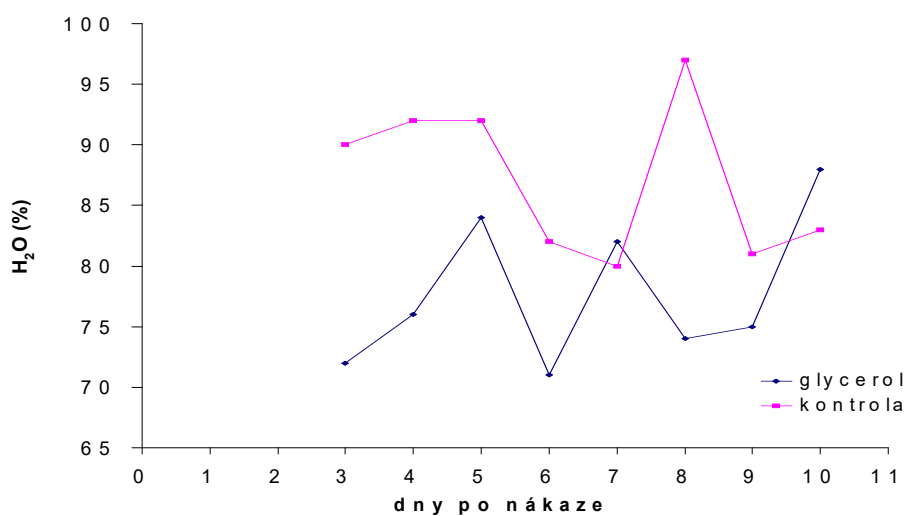
DPI/ tele	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8	9	10	11	12	13
22/K	Neg	Neg	+	+++	++	-	+	++++	++++	++++	+	+	Neg	Neg	Neg
			(0,001)	(11)	(2)		(0,6)	(87)	(70)	(46)	(0,45)	(0,01)			
53/K	Neg	+	+++	++	+++	-	+++	++++	++++	+	++	+	Neg	Neg	Neg
		(0,25)	(11)	(4)	(12)		(16)	(33)	(78)	(1)	(2)	(0,01)			
36/K	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	+	++++	+	+	+	+	Neg
								(0,1)	(1)	(34)	(0,5)	(0,2)	(0,2)		
57/K	Neg	Neg	+	++	+	-	++	++++	++++	++	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
			(0,001)	(5)	(0,4)		(3)	(40)	(80)	(4)					
33/K	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	+	++	++	++	+	+	Neg
								(0,1)	(0,02)	(4)	(2)	(3)	(0,2)	(0,01)	
34/K	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	++	++++	++++	+++	++	+	Neg.	+	Neg
						(0,2)	(5)	(42)	(83)	(15)	(5)	(0,01)		(0,01)	
31/G	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	+	+++	+++	+	Neg	Neg	Neg	Neg
							(0,02)	(1)	(24)	(9)	(0,02)				
35/G	Neg	Neg	Neg	Neg	++	++	++	++++	++++	++++	++++	+	+	Neg	Neg
					(5)	(3)	(4)	(46)	(60)	(120)	(32)	(0,1)	(0,2)		
56/G	Neg	Neg	Neg	Neg	+	-	+	++	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
					(0,001)		(0,001)	(2)	(0,2)	(0,01)					
59/G	Neg	Neg	Neg	+	+	-	+++	++++	++++	++++	+++	+	+	Neg	Neg
				(0,001)	(0,5)		(20)	(90)	(32)	(36)	(20)	(0,08)	(0,08)		
37/G	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	+	+	++++	+	+	+	Neg	Neg
							(0,01)	(0,1)	(0,2)	(32)	(0,5)	(0,05)	(1)		
38/G	Neg	Neg	Neg	Neg	+	Neg.	++	++++	++++	++++	+++	+	+	+	Neg
					(0,1)		(5)	(30)	(50)	(120)	(9)	(1)	(0,02)	(0,01)	

Graf 1. Vylučování oocyst ve výkalech



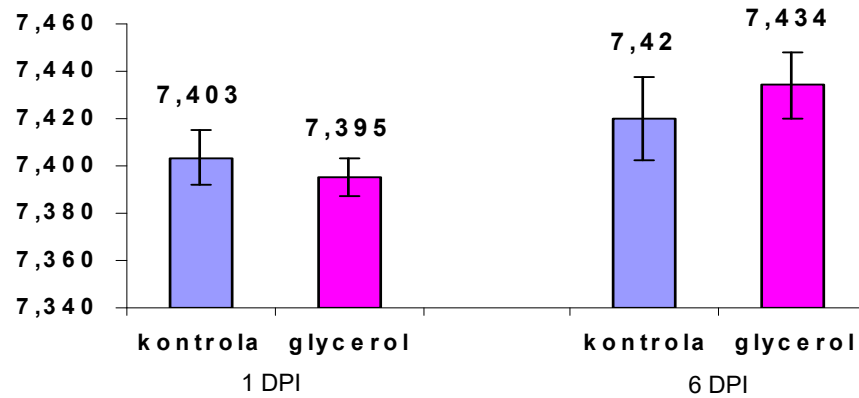
5.2 Obsah vody ve výkalech

Graf 2. Procentuální zastoupení vody ve výkalech

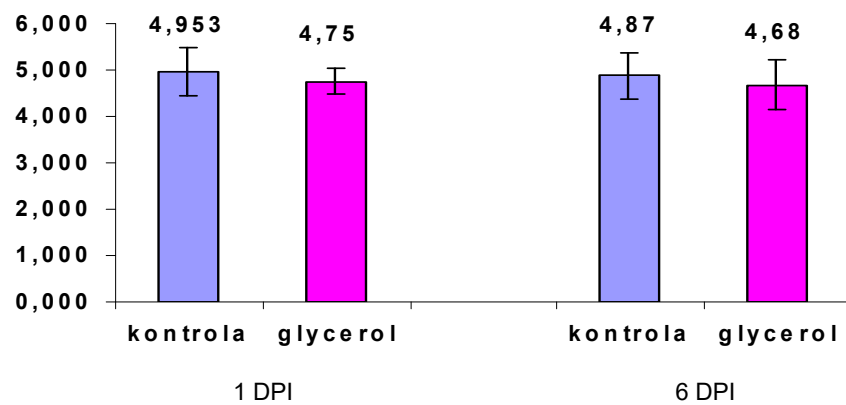


5.3 Parametry acidobazické rovnováhy krve v 2. a 6. dnu po infekci (DPI) - graf 3-9:

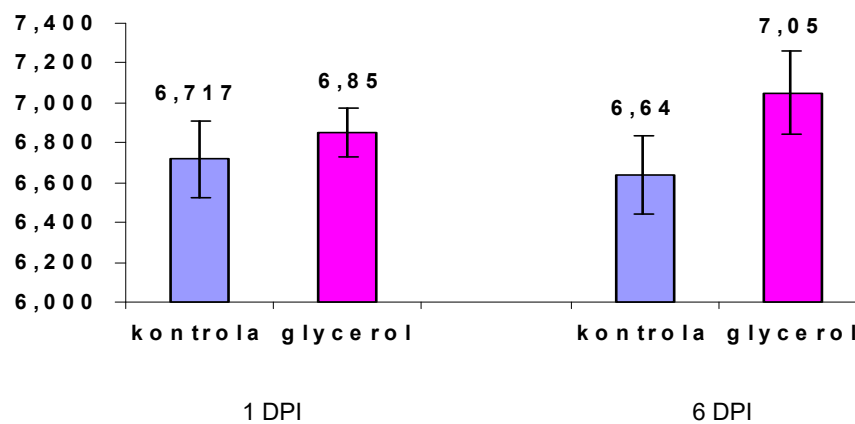
Graf 3. pH krve



Graf 4. Parciální tlak O₂ (kPa)



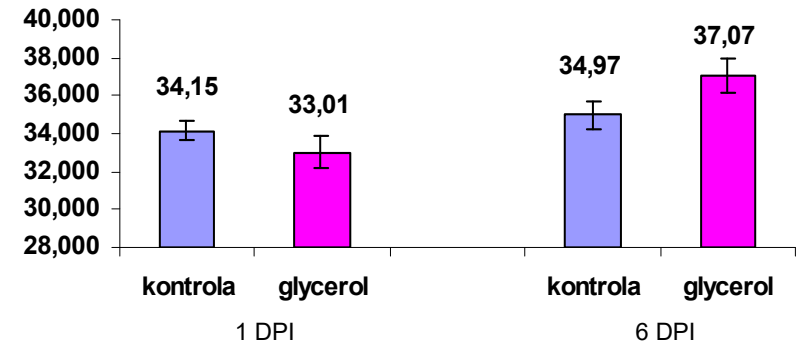
Graf 5. Parciální tlak CO₂ (kPa)



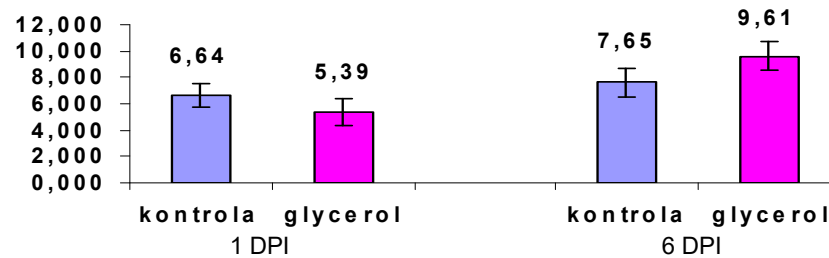
Graf 6. Koncentrace HCO_3^- (mmol/l)



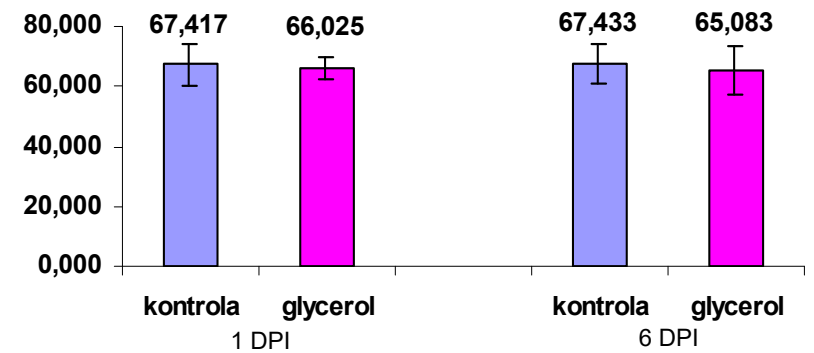
Graf 7. Celková koncentrace CO_2 (mmol/l)

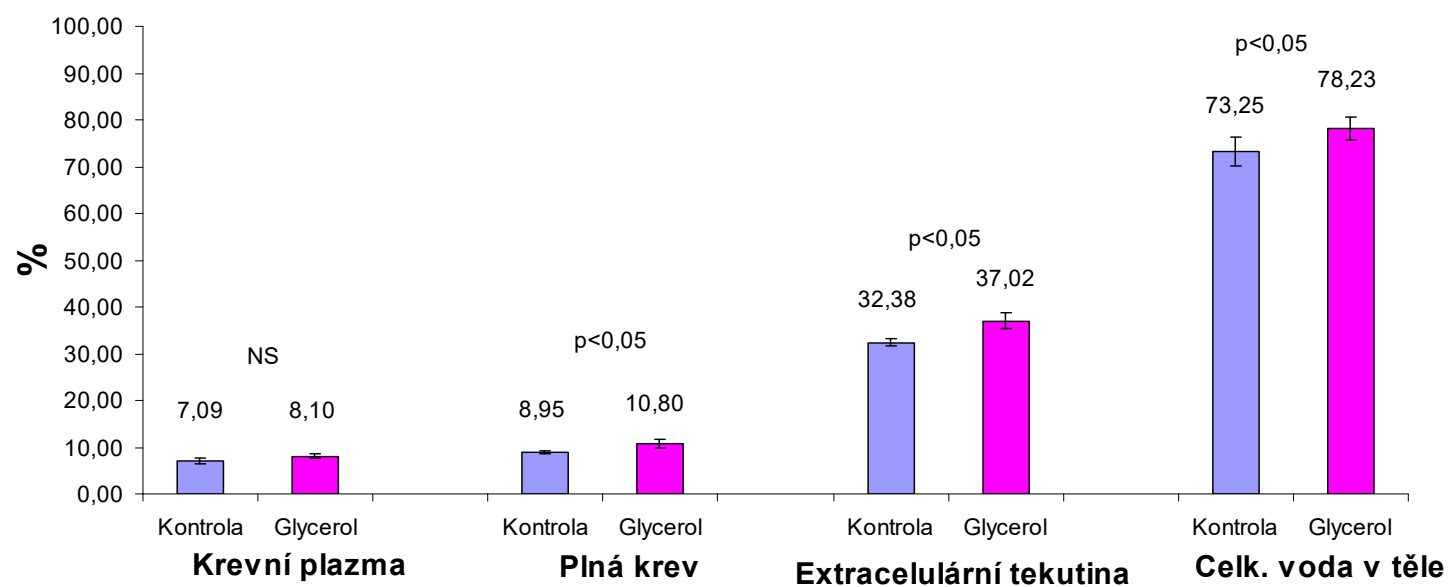


Graf 8. Celková koncentrace zásad (mmol/l)



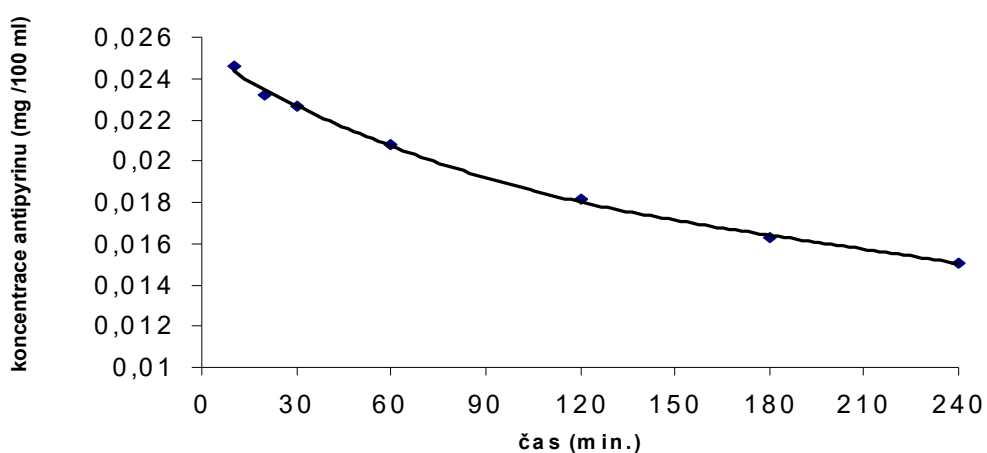
Graf 9. Saturace krve kyslíkem (%)



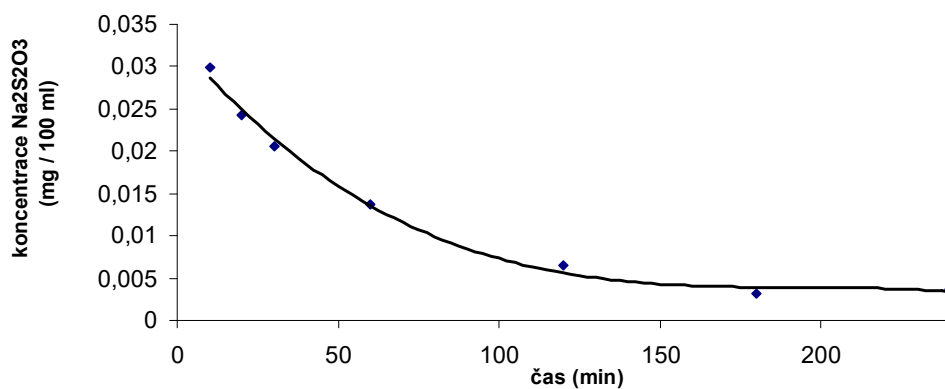
Graf 10. Vliv podávání glycerolu na změny objemu tělních tekutin

5.5 Eliminace markerů z krevní plazmy

Graf 11. Eliminace antipyrinu z krevní plazmy telat po i.v. aplikaci 10 ml 40 % (w/v) roztoku



Graf 12. Eliminace thiosíranu sodného z krevní plazmy telat po i.v. aplikaci 20 ml 25% (w/v) roztoku



5.6 Hodnoty vybraných biochemických ukazatelů krevní plazmy telat

tab.3: Hodnoty biochemických ukazatelů krevní plazmy telat

	Glukoza (mmol/l)		celk.bilkovina (g/l)		Močovina (mmol/l)		Triglyceridy (mmol/l)	
	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol
průměr	4,96	3,96	60,46	52,18	4,19	2,85	0,28	0,08
SD	0,58	0,61	2,77	3,29	0,27	0,62	0,01	0,04

tab. 4: Hodnoty minerálního profilu krevní plazmy telat

	Ca (mmol/l)		Na (mmol/l)		K (mmol/l)		Cl (mmol/l)	
	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol	kontrola	glycerol
průměr	2,91	2,52	134,33	133,8	4,55	4,494	99,33	103,8
SD	0,10	0,06	2,08	3,42	0,29	0,15	2,28	1,6

6. Diskuse

6.1 Klinický průběh onemocnění

Experimentální infekce měla u všech sledovaných zvířat typický klinický průběh. Průjem se objevil u všech sledovaných zvířat 3. – 4. den *p.i.* a trval 2 – 5 dnů. U většiny zvířat byl úporný a vodnatý. Fayer *et al* (1998) uvádí u 1-3 denních telat infikovaných *C. parvum* výskyt úporných průjmů 3. – 5. den *p.i.* v délce trvání 4 – 17 dnů.

Délka prepatentní periody se v našem pokusu pohybovala mezi 2,5 a 5 dny. Doba vylučování oocyst se pohybovala mezi 5 a 10 dny. Nejvyšší koncentrace oocyst byly zjišťovány mezi 6. - 8. dnem *p.i.* To je v souladu se zjištěním Fayera *et al* (1998), který ve své studii uvádí délku prepatentní periody 3 – 6 dní. Délka patentní periody se pohybovala mezi 6 – 8 dny, nejvyšší počty oocyst zjišťoval 6. – 8. den *p.i.*

Koncentrace oocyst byly během průběhu průjmu extrémně vysoké, u některých telat i více než 120 oocyst v zorném poli. Klein (2002) uvádí pro stejnou diagnostickou techniku jako vysokou koncentraci oocyst během akutní fáze infekce hodnoty kolem 30 oocyst v zorném poli. Z toho plyne, že podávání rehydratačních mělo za následek zvýšení koncentrace oocyst ve výkalech, což je vysvětlitelné jednak nepřítomností chymu respektive výkalů, ve kterých se oocysty u normálně krmených telat rozředí, ale také je zvýšení koncentrace oocyst vysvětlitelné náhlým ústupem průjmu po zahájení rehydratační terapie a zpomalením střevní pasáže.

6.2 Obsah vody ve výkalech - průběh průjmu

V grafu procentuálního zastoupení vody ve výkalech telat lze pozorovat tendenci k nižším ztrátám vody střevem u telat, kterým byl podáván roztok s přídavkem glycerolu. Tento parametr byl sledován od 3. do 10. dne *p.i.*, tedy v době symptomů onemocnění. Procentuální hodnoty obsahu vody ve výkalech byly u telat značně individuální, avšak u kontrolní skupiny byly pozorovány vyšší ztráty vody, což naznačuje, že glycerol má patrně schopnost poutat vodu i ve střevě. Snížení obsahu vody je však díky vysoké variabilitě sledovaného parametru statisticky neprůkazné.

K nejvyšším ztrátám vody výkaly došlo u pokusných telat mezi 4. – 5. dnem *p.i.* a dále kolem 7. a 10. dne *p.i.* a maximální hodnoty obsahu vody ve výkalech se pohybovaly okolo 85 %. U telat z kontrolní skupiny se nejvyšší zastoupení vody vyskytovalo 3. – 5.

den *p.i.* a dále kolem 8. dne *p.i.* a dosahovalo až 97 %. Od 5. do 7. dne *p.i.*, tedy v době rehydratační terapie se ztráty vody výkaly u obou skupin snížily, což lze vysvětlit nepřítomností tráveniny ve střevě a zároveň zpomalením střevní pasáže, a u pokusné skupiny patrně i přítomností glycerolu v rehydratačním roztoku. Kolem 8. dne *p.i.* je opět zřejmý nárůst obsahu vody ve výkalech, což můžeme vysvětlit tím, že telata byla převedena zpět na MKS a střevní epitel nebyl dosud zcela regenerován. Pomocí laktulózy / manitolového testu zjistil Klein (2002) ve své studii provedené na novorozených telatech normální hodnoty střevní propustnosti až kolem 21. dne *p.i.* Uvádí také procentuální zastoupení vody ve výkalech v průběhu kryptosporidiózy. Nejvyšší ztráty vody výkaly se v této studii pohybovaly u infikovaných telat mezi 4. – 8. dnem *p.i.* Hodnoty obsahu vody ve výkalech dosahovaly u infikovaných telat až 95 %, naopak u zdravých telat z kontrolní skupiny se hodnoty obsahu vody pohybovaly ve fyziologické normě kolem 70 %. Od 10. dne *p.i.* se ztráty vody výkaly u infikovaných telat snížily také na fyziologickou normu. Můžeme tedy předpokládat, že i u telat v našem experimentu došlo po 10. dnu *p.i.* k poklesu ztrát vody výkaly, což je v souladu s předchozími údaji o klinickém průběhu onemocnění u telat.

6.3 Změny acidobazické rovnováhy

Pro zjišťování metabolické poruchy jsou hlavními parametry hodnoty pH krve, parciálního tlaku CO_2 , BE a HCO_3^- . Podle Michella *et* Grove-Whitea (2001) však není měření pH krve tak průkazným indikátorem pro zjištění celkového acido-bázického stavu při metabolických poruchách, jako zjištění celkového CO_2 nebo HCO_3^- .

Z výsledků rozborů krve na parametry acidobazické rovnováhy plyne, že v průběhu rehydratační terapie byl ovlivněn parciální tlak CO_2 a celkový CO_2 v krvi a to v 6. dnu po infekci, tedy v době podávání rehydratačních roztoků. Ostatní parametry acidobazické rovnováhy se mezi skupinami nelišily.

pH krve obou skupin telat se pohybovalo ve fyziologickém rozmezí 7,36 – 7,43 (SLANINA, 1991) v 2. i v 6. dnu po infekci. Parciální tlak CO_2 v 2. i 6. dnu byl vyšší u skupiny pokusné ($p < 0,05$), zatímco celkový tlak CO_2 byl v 1. dnu u pokusné skupiny nižší než u kontrolní a v 6. dnu vyšší ($p < 0,05$). Hodnoty pCO_2 se pohybovaly v 2. i v 6. dnu *p.i.* nad fyziologickou normou, kterou uvádí Slanina (1991), to znamená v rozpětí 4,86 – 6,20 kPa. Nad referenční hodnotou je shodně u obou skupin též množství HCO_3^-

(referenční rozmezí 22,3 - 27,0 mmol/l) a BE (base excess), tedy množství zásad v krvi (referenční rozmezí -0,5 - +3,5 mmol/l) v 2. i v 6. dnu *p.i.*, a proto lze usuzovat na lehkou metabolickou alkalózu, ke které docházímimo jiné také při funkčních poruchách střeva, zejména ilea (SLANINA, 1993).

K podobným výsledkům došel ve studii provedené na novorozených telatech s experimentálním průjmem i Constable *et al* (2001). Při porovnávání vlivu mléčné směsi, hyperosmotického a iso-osmotického rehydratačního roztoku na parametry acidobazické rovnováhy a hydratační stav uvádí, že zatímco podávání mléčné náhražky vyvolalo mírnou metabolickou acidózu, oba rehydratační roztoky měly za následek vzestup hladiny hydrogenuhličitanu a base excess v krvi a tím vnik metabolické alkalózy. pH krve stejně jako pCO₂ však zůstalo nezměněno, zatímco v našem pokusu se hladina pCO₂ zvýšila což bylo pravděpodobně zapříčiněno sníženou ventilací plic v důsledku kompenzace hydrogenuhličitanu.

Podle disociační křivky hemoglobinu vykazuje saturace krve kyslíkem fyziologické hodnoty pro venózní krev při zjištěném pO₂ a pH krve (<http://members.aol.com/Bio50/LecNotes/lecnot20.html>). S rostoucím parciálním tlakem CO₂ však klesá schopnost hemoglobinu vázat kyslík. Parciální tlak kyslíku také odpovídá fyziologické normě pro venózní krev, která se pohybuje u skotu v rozmezí 4,66 – 7,06 kPa (KRAFT *et* DÜRR, 1999). Podle Krafra *et* Dürra (1999) však není měření parciálního tlaku kyslíku klíčové pro zjišťování acidobázické rovnováhy a následné určení metabolické poruchy. Jeho hodnoty se používají pro zjištění využití kyslíku v organizmu.

Výsledek studie Constablea *et al* (1998) naznačuje, že úhyn v důsledku průjmového onemocnění, není zapříčiněn pouze dehydratací organizmu, ale velkou roli zde hraje i acidobazická rovnováha a elektrolytový profil. V důsledku alkalózy se může u telat vyskytnout mírná hypokalcémie a hypomagneziémie, ke kterým často dochází právě při průjmových onemocněních, poruchách tenkého střeva a poruchách metabolismu (SLANINA, 1991). V průběhu průjmu sledovali u telat Tennant *et* Reina-Gueria (1968) hyponatrémii, hyperkalémii, hyperfosfatémii a hypoglykémii, zatímco chloridy v krevní plazmě se podle Groutidesa *et* Michella (1990) nemění. Gamble *et al* (1945) popisuje u dětí, které trpěly úpornými průjmy, metabolickou alkalózu provázenou hypochlorémií a hypokalcemií.

V našem experimentu jsme zjišťovali množství Ca, K, Na, a Cl v krevní plazmě telat v 9 dnu *p.i.*, tedy 48 hodin po zahájení rehydratační terapie. Zjištěné hodnoty

minerálního profilu se pohybovaly v referenčních rozmezích. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl shledán pouze u vápníku (glycerol vs. kontrola, 133,8 mmol/l vs. 134,33 mmol/l; $p < 0,05$). U ostatních prvků (draslík: 4,49 mmol/l vs. 4,55 mmol/l; sodík: 133,8 mmol/l vs. 134,33 mmol/l; chlor: 103,8 mmol/l vs. 99,33 mmol/l) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.

Také hladina glukózy v krvi (3,96 mmol/l vs. 4,96 mmol/l) se pohybovala ve fyziologické normě a mezi skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Statisticky významné změny se však objevily u množství močoviny u pokusné, respektive kontrolní skupiny (2,85 mmol/l vs. 4,19 mmol/l; $p < 0,05$), celkových bílkovin (52,18 g/l vs. 60,46 g/l; $p < 0,05$) a triglyceridů (0,088 mmol/l vs. 0,28 mmol/l; $p < 0,05$). Ovšem všechny tyto parametry se u obou skupin pohybují také ve fyziologických normách.

Glykémie u telat je závislá na jejich věku. Bezprostředně po narození je nízká, po přijetí mleziva stoupá a nejvyšších hodnot dosahuje 14. až 21. den po narození. S rozvojem předžaludků se snižuje a stabilizuje se ve věku 2 – 3 měsíců. Při průměrných onemocněních mají telata tendenci k hypoglykémii v důsledku nedostatku energetických rezerv a snížené resorpční funkce střevní sliznice. Při snížení hladiny glukózy v krevní plazmě, např. při hladovění, stoupá mobilizace triacylglycerolů (triglyceridů) a jejich metabolismu, čímž se šetří glukóza (SLANINA, 1991). Glykémie podléhá hormonální kontrole a organismus se fyziologickou hladinou glukózy v krvi snaží udržet odbouráváním energetických rezerv, včetně bílkovin. Proto je jejich katabolismus provázen i vzestupem koncentrace močoviny v krvi (VAJDA, 1991). Také při zvýšeném příjmu bílkovin nebo při poruchách renálních funkcí stoupá tvorba močoviny a její koncentrace v krevní plazmě (SCHENCK *et* KOLB, 1991). Klein (2002) uvádí u telat infikovaných kryptosporidiózou vyšší koncentrace močoviny v plazmě v 6. a 13. dnu *p.i.* a mírnější vzestup glukózy v krvi po nakrmení, bezpochyby díky nižší absorpční kapacitě infikovaného epitelu pro glukózu, jak dokládají i průběhy absorpčních křivek pro D-xylózu v této studii. Constable *et al* (2001) však uvádí ve své studii provedené na telatech trpících průměrným pokles celkových bílkovin, močoviny a vápníku během 48 hodinové rehydratační terapie. K podobnému závěru došel i Mitchell *et al* (1992), který také uvádí pokles močoviny v průběhu rehydratace telat. V jiné studii Constablea *et al* (1998) je uvedeno, že telata trpěla mírnou metabolickou acidózou a byla u nich zjištěna hyperfosfatémie, hypokalcémie a hypochlorémie, avšak žádné změny nenastaly v koncentraci sodíku.

Z těchto výsledků tedy plyne, že ani u jedné ze skupin nebylo pozorováno výraznější narušení homeostázy organismu telat. Výsledky měření u obou skupin byly statisticky porovnány testem dle Wilcoxon. Ani hodnoty biochemického rozboru krve nevykázaly výrazné změny v průběhu rehydratační terapie a ani přidání glycerolu do rehydratačního roztoku tyto parametry neovlivnilo. Tyto výsledky byly srovnány t-testem.

6.4 Eliminace thiosíranu sodného a antipyrinu z krevní plazmy telat

V grafech 11.a 12. je uvedena ukázka eliminace atipyrinu resp. thiosíranu sodného z krevní plazmy telete v závislosti na čase. První clearance thiosíranu se objevuje již kolem 10 minuty od intravenózní aplikace. Zhruba do 120 min. od aplikace křivka prudce klesá, dále pak má mírný průběh. Toto naše zjištění se shoduje s výsledky studie, kterou provedli Ross *et al* (1991) na býcích, kde uvádí první clearance thiosíranu z krevní plazmy během 12-ti minut po i.v. aplikaci. Rovněž průběh křivky je shodný jako v naší studii. Podobné výsledky zjistili i Gilman *et al* (1946), Newman *et al* (1946) nebo Dalton (1964), kdy se první clearance v jejich studiích objevuje v mezi 10 – 20 min. po aplikaci markeru. Eliminace antipyrinu má mírnější průběh než je tomu u thiosíranu. V našem pokusu se u telat objevuje první clearance antipyrinu již kolem 10 min. po intravenózní aplikaci markeru. Toto zjištění se shoduje s výsledky studie provedené na lidech (SOBERMAN *et al*, 1949) a s výsledkem práce Saitoha *et al* (2000), kde byla předmětem zkoumání clearance antipyrinu z krevní plazmy králíků.

6.5 Vliv rehydratačních roztoků na změny objemu tělních tekutin

Lewis *et Phillips* (1972) uvádí, že ztráty hmotnosti o 12,7 – 13,4 % během průjmu, zapříčiněné ztrátami tekutin z organismu, vedou až ke smrti zvířete. Podobné výsledky zjistili i Corke (1988) a Simmons *et Baywater* (1991), kteří u novorozených telat trpících průjmy uvádí fatální následky při ztrátě hmotnosti 12 – 14 %.

Při dehydrataci v důsledku průjmu je u telat znatelný značný pokles extracelulární tekutiny, přičemž bylo možno pozorovat vzestup tekutiny intracelulární (Phillips *et Lewis*, 1973). Extracelulární tekutina se v důsledku toho stává hypoosmotickou (Lewis *et Phillips*, 1973).

Constable *et al* (1998) uvádí pokles objemu krevní plazmy během 48 hodin u telat trpících průjmami a dehydratací až o 26 % a pokles distribučního prostoru thiokyanátu sodného až o 33 %, přičemž redukce distribučního prostoru thiokyanátu byla větší než úbytek hmotnosti telat. S tím souvisí i to, že prvotní ztráty tekutin byly z extracelulárního prostoru. Na rozdíl od prací Lewise *et Phillipa* (1972) nebo Simmonse *et Baywatera* (1991), Constable *et al* (1998) neuvádí úhyn telat při silné acidóze a ztrátách hmotnosti až 14 %.

Z výsledků měření objemů tělních tekutin vyplývá, že u pokusné skupiny došlo po přijetí stejné dávky rehydratačního roztoku k jejich navýšení. Rozdíl v množství krevní plazmy se ukázal u pokusné, respektive kontrolní skupiny statisticky neprůkazným (8,09 vs. 7,09 %, NS), avšak u množství krve (10,79 vs. 8,95%, $p < 0,05$), extracelulární tekutiny (37,02 vs. 32,38 %, $p < 0,05$) a celkové vody v těle (78,23 vs. 73,25 %, $p < 0,05$) byl zaznamenán signifikantní rozdíl. Lyons *et Riedesel* (1993) uvádí ve studii provedené na potkanech nárůst celkového objemu celkové vody v těle u jedinců, kterým byla podána voda s 5 % glycerolu v dávce 20 ml/kg ($69,7 \pm 0,4$ % vs. $67,8 \pm 0,3$ %, $p < 0,01$). Nesignifikantní změny byly naopak pozorovány u extracelulární tekutiny u pokusných, respektive kontrolních zvířat ($17,0 \pm 0,3$ % vs. $17,4 \pm 0,1$ %) a u objemu krevní plazmy ($4,4 \pm 0,1$ % vs. $4,5 \pm 0,1$ %). Scheet *et al* (2001) ve studii provedené na lidech uvádí nárůst objemu krevní plazmy během 60 minut po podání 1 g glycerolu / kg ž.hm. Statisticky významný rozdíl v objemu krevní plazmy mezi skupinou mužů v této studii, kterým byl podán roztok s obsahem glycerolu a skupinou kontrolní byl: $11,0 \pm 2,1$ % vs. $4,9 \pm 0,7$ % ($p < 0,05$).

Výsledky našeho pokusu naznačují, že glycerol i u telat dosti snadno a rychle proniká do všech tělesných kompartmentů, ve kterých efektivně zadržuje vodu. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky uvedených prací Scheeta *et al* (2001) a Lyonse *et Riedesela* (1993). Také studie Montera *et al* (1996), Riedesela *et al* (1987) nebo Lyonse *et al* (1990) jsou důkazem toho, že glycerol podaný v dávkách od 0,5 do 1,5 k / kg ž.hm. může u lidí zvýšit množství zadržené tekutiny v organizmu až o 40 %. V našem pokusu je pozitivní efekt glycerolu patrný zejména u objemu extracelulární tekutiny, jejíž ztráty bývají v důsledku průjmu nejvyšší, a jehož korekce je pro přežití zvířete klíčová (MICHELL *et al*, 1992).

7. Závěr

V předkládané práci byl sledován účinek přídatku glycerolu do rehydratačního roztoku na parametry acidobázické rovnováhy, na objemy tělních tekutin a na vybrané biochemické parametry krve u telat s infekčním průjmovým onemocněním modelovaným experimentální kryptosporidiózou.

Z výsledků vyplývá, že podávání glycerolu nemělo signifikantní vliv na parametry acidobázické rovnováhy. Díky zvýšenému množství hydrogenuhličitanu a bázi v krvi se u telat objevila lehká metabolická alkalóza, která však byla zřejmě důsledkem narušení funkce střevního epitelu a bylo možné ji pozorovat u obou skupin. Hodnoty biochemického rozboru krve také nebyly ovlivněny rehydratační terapií, respektive přídatkem glycerolu v rehydratačním roztoku. Všechny zjišťované parametry se pohybovaly ve fyziologických normách.

Zvýšený nárůst objemu jsme však zjistili u krve, extracelulární tekutiny a celkové vody v těle. U telat, kterým byl podán rehydratační roztok s přídatkem glycerolu, byly tyto objemy signifikantně vyšší než u telat z kontrolní skupiny. Přídatek glycerolu v dávce 1 g / kg ž.hm. v rehydratačním roztoku měl tedy pozitivní vliv na udržení objemů tělních tekutin.

Vzhledem k tomu, že jsou telata v postnatálním období výrazně hydrolabilnější a prvotním cílem péče o ně by mělo být zamezení dehydratace, mohou být výsledky této studie využity pro zkvalitnění symptomatické terapie průjmových onemocnění vyskytujících se v chovech telat.

8. Seznam použitých zkratek

p.i. – po infekci

MKS – mléčná krmná směs

EM – Evansova modř

TS – thiosíran sodný

AP – antipyrin

W/V – weight/volume; poměr hmotnosti a objemu

NS – statisticky nevýznamný rozdíl

DPI – dny po infekci

PBS – fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku

9. Přehled citované literatury

Acra SA, Ghishan FK: Electrolyte fluxes in the gut and oral rehydration solutions. *Ped Clin North Am* 1996; **43 (2)**: 433-49

Argenzio RA, Liacos JA, Levy ML, Meuten DJ, Lecce JG, Powell DW: Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology* 1990; **98(5 Pt 1)**:1129-40

Arrowood MJ, Sterling CR: Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites usány discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J Parasitol* 1987; **73 (2)**: 314-9

Avery ME, Snyder JD: Oral therapy for acute diarrhea. *New England J Med* 1990; **323**:891-894

Bancroft J, Kennedy JA, Bason MF: The blood volume and kindred properties in pregnant sheep. *J Physiol* 1939; **95**:159 – 172

Banwell JG: Patophysiology of diarrheal disorders. *Rev Infect Dis* 1990;**12(Suppl 1)**:S30-5

Barker IK, Carbonell PL: *Cryptosporidium agni* sp.n. from lambd, and *Cryptosporidium bovis* sp.n. from a calf, with observations on the oocyst. *Z Parasitenkd* 1974; **44 (4)**: 339-43

Bell FR, Razig SAD: Gastric emptying and secretion in the milk-fed calf. *J Physiol* 1973; **228**:499-526

Booth AJ, Naylor JM: Correction of metabolic acidosis in diarrheal calves by oral administration of electrolyte solutions with or without bicarbonate. *J Am Vet Med Assoc* 1987; **191**:62

Brodie BB, Axelrod J, Soberman R, Levy BB: The estimation of antipyrine in biological materials. *J Biol Chem* 1949; **179**:25-29

Brooks HW, White DG, Wagstaff AJ, Michell AR: Evaluation of a nutritive oral rehydration solution for the treatment of calf diarrhoea. *Brit Vet J* 1996; **152**:699-708

Cardozo RH, Edelman IS: The volume of distribution of sodium thiosulfate as a measure of extracellular fluid space. *J Clin Invest* 1952; **31(3)**:280-290

Constable PD, Thomas E, Boisrame B: Comparison of two oral electrolyte solutions for the treatment of dehydrated calves with experimentally induced diarrhoea. *The Vet J* 2001; **162**:129-140

Corke MJ: Economical preparation of fluids for intravenous use in cattle practice. *Vet Rec* 1988; 305-307.

Dalton RG, Fisher EW: Plasma and blood volumes in Ayrshire cattle. *Br Vet J*, 1961; **117**: 115-119

Dalton RG: Measurement of extracellular fluid volume in cattle with sodium thiosulfate. *Br Vet J* 1964; **120**:117

Dalton RG: Measurement of body water in calves. *Brit Vet J* 1964b; **120**:378

Dawson AB, Evans HM, Whipple GH: Blood volume studies: III. Behavior of Large Series of Dyes Introduced into the Circulating Blood. *Am J Physiol* 1920; **51**:232-256

De Graf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 1999; **29 (8)**: 1269-87

Desjeux JF, Briend A, Brutzner JD: Oral rehydration solution in the year 2000: pathophysiology, efficacy and effectiveness. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1997; vol.11,no.3

Elkinton JR, Dankowski TS: The Body Fluids. Basic Physiology and Practical Therapeutics. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA; 1955; p. 79

English PB: A study of water and electrolyte metabolism in Sheep- II- The volumes of distribution of Antipyrine, Thiosulphate and T-1824 (Evans Blue) and values for certain extracellular fluid constituents. *Res Vet Sci* 1966; **7**: 258–275

Fayer R, Speer CA, Dubey JP: The general biology of *Cryptosporidium*, In Fayer R *et al*: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, Fla. 1997: 1-41

Fayer R, Gasbarre L Pasquali P, Canals A, Almeria S, Zarlenga D: *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol* 1998; **28(1)**:49-56

Fayet JC: Recherches sur le métabolisme hydrominéral chez le veau normal ou en état diarrhée. *Rech Vétér I* 1968;117-126

Fayet JC: Plasma and faecal osmolality, water kinetics and body fluid compartments in neonatal calves with diarrhoea. *Brit Vet J* 1971; **127**:37-43

Fellers FW, Barnett HL, Hare K et al: Change in thiocyanate and sodium spaces during growth. *Pediatrics* 1949; 3:622-629

Fettman MJ, Brooks PA, Burrows KP, Phillips RW: Evaluation of commercial oral replacement formulas in healthy neonatal calves. *J Am Vet Med Assoc* 1986; **188**:397-401

Foldager N, Blomqvist CG: Repeated plasma volume determination with the Evans Blue dye dilution technique: the method and a computer program. *Comput Biol Med.* 1991; **21 (1-2)**:35-41.

Frank MSB, Nahata MC, Hilty MD: Glycerol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, adverse reactions, and clinical use. *Pharmacotherapy* 1981; **1**:147-60

Freund BJ, Montain SJ, Young AJ, Sawka MN, DeLuca JP, Pandolf KB Valeri CR: Glycerol hyperhydration: hormonal, renal, and vascular fluid responses. *J Apply Physiol* 1995; **79**:2069-2077

Gamble JL, Gahey KR, Appelton J, Mac Lachlan E: Congenital alkalosis with diarrhoea. *J Pediatr* 1945; **26**:509-518

Garcia JP: A practitioner's views on fluid therapy in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1999; **15 (3)**: 533-43

Gilman A, Philips FS, Koelle ES: The renal clearance of thiosulfate with observations on its volume of distribution. *Am J Physiol* 1946; **146**:348

Gleeson M, Maughan RJ, Greenhaff PL. Comparison of the effects of pre-exercise feeding of glucose, glycerol and placebo on endurance and fuel homeostasis in man. *Eur J Appl Physiol* 1986; **55**:645-53

Gookin JL, Nordon SK, Argenzio RA: Host responses to Cryptosporidium infection. *J Vet Intern Med* 2002; **16**: 12-21

Greenblatt et Lockniskar: Pharmacol Biopharm. *Int J Clin* 1979; **17 (9)**: 401-404

Gregersen MI, Gibson JG, Stead EA: Plasma volume determination with dyes: errors in colorimetry; use of the blue dye T-1824. *Am J Physiol* 1935; **113**:54-55

Gregersen MI, Rawson RA: The disappearance of T-1824 and structurally related dyes from the blood stream. *Amer J Physiol* 1942; **138**:698-707

Harp JA, Goff JP: Strategies for the control of Cryptosporidium parvum infection in calves. *J Dairy Sci* 1998; **81(1)**:289-94

Henriksen SA, Pohlenz JFL: Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 1981; **22**: 594-6

Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA: Complete development of Cryptosporidium parvum in host cell-free culture. *Int J Parasitol* 2004; **34**:769-777

Hix EL, Underbjerg GKL,, Hughes JS: The Body Fluids of Ruminants and Their Simultaneous Determination. *Am J Vet Res* 1959; 184-191

Holland RE, Herdt TH , Refsal KR: Pulmonary excretion of H₂ in calves with Cryptosporidium-induced malabsorption. *Dig Dis Sci* 1989; **34 (9)**: 1399-404

Holland RE, Boyle SM, Herdt TH, Grimas SD, Walker RD: Malabsorption of vitamin A in preruminating calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am J Vet Res* 1992; **3 (10)**: 1947-52

Huetink REC, van der Giessen JWB, Noordhuizen JPTM, Ploeger HW: Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. And *Giardia duodenalis* on dairy farm. *Vet Parasitol* 2001; **102**:53-67

Ikkos D: Comparison of the volume of distribution of sucrose, inulin and thiosulfate in human subjects. *Metabolism* 1955; **4(1)**:19-28

Jones R, Phillips RW, Cleek J: Hyperosmotic oral replacement fluid for diarrheic calves. *J Am Vet Med Assoc* 1984; **184**:1501-5

Jurášek V, Dubinský P *et al*: Veterinární parazitologie. 1. vydání, Příroda, Bratislava 1993, 382 s.

Kami G, Merritt AM, Duelly P: Preliminary studies of plasma and extracellular fluid volume in neonatal ponies. *Equine Vet J* 1984; **16**:356-358

Kennedy JA, Millikan GA: A micro blood volume method using a blue dye and photocell. *J Physiol* 1938; **93**:276 – 284

Klein P: Vliv protozoární infekce na stravitelnost živin a střevní funkce u novorozených telat. Disertační práce. Agronomická fakulta ČZU, Praha. 2002. 82 s.

Korbová L, Kohout J, Balaš V: Patofyziologie trávicího ústrojí, 1. vydání, *Avicenum*, Praha, 1985, 377 s.

Kowalski HJ, Rutstein DD, Schaufus RI, Shoulberg JM: The distribution of the thiosulfate ion with respect to normal human serum and red blood cells and its application to “extracellular fluid” determination. *J Clin Invest* 1952; **31(4)**:370–374

Kraft W, Dürr U: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. *F.K. Schattauer GmbH*; Stuttgart, 1999, 365 str.

Kraybill HF, Goode ER, Robertson SB, Sloane HS: In vivo measurement of body fat and body water in swine. *J Appl Physiol* 1953; **6**:27-32

Kraybill HF, Hankins OG, Bitter HL: Body composition of cattle. I. Estimation of body fat from measurement in vivo of body water by use of antipyrine. *J Appl Physiol* 1951; **3**:681-689

Kukuruzovic RH, Haase A, Dunn K, Bright A, Brewster DR: Intestinal permeability and diarrhoeal disease in Aboriginal Australians. *Arch Dis Child* 1999; **81(4)**:273-81

Latzka WA, Sawka MN, Montain SJ, Skrinar GS, Fielding RA, Matott RP, Pandolf KB: Thermoregulatory effects during compensable exercise-heat stress. *J Apply Physiol* 1997; **83**:860-866

Levine ND: Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apikomplexa). *J Protozool* 1984; **31 (1)**: 94-8

Levitt MF, Gaudino M: Measurement of body water compartments. *Am J Med* 1950; **9(2)**:208–215.

Levy M, Merrit AM, Levy LC: Comparison of the effects of an isosmolar and hyperosmolar oral rehydrating solution on the hydration status, glycemia and ileal content composition of healthy neonatal calves. *Cornell Vegetarian* 1990; **80**:143-51

Lewis LD, Phillips RW: Water and electrolyte losses in neonatal calves with acute diarrhea: A complete balance study. *Cornell Vet* 1972; 596-607.

- Lewis LD, Phillips RW: Diarrheic induced changes in intracellular and extracellular ion concentrations in neonatal calves. *Ann rech veter* 1973; 99-111.
- Lyons TP, Riedesel ML, Meuli LE et al: Effects of glycerol induced hyperhydration prior to exercise in the heat on sweating and core temperature. *Med Sci Sports Excerc* 1990; **22(4):**477-83
- Lyons TP, Riedesel ML, Meuli LE, Chick TW: Effects of glycerol-induced hyperhydration prior to exercise in the heat on sweating and core temperature. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1990; **22:** 477-483
- Lyons TP, Riedesel ML: Glycerol-induced hyperhydration: its effects on fluid compartments in the rat. *Life Sciences* 1993; vol.53, pp.1779-1787
- Mackie WS: Plasma volume measurements in sheep using Evans' blue and continuous blood sampling. *Res Vet Sci* 1976; **21:**108-109
- Mac Kenzie WR, Schell WL, Blair KA et al: Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis* 1995; **21:**57-62
- Mc Muraay CH, Logan EF, Mc Parland PJ, Mc Roy FJ, O'Neill DG: Sequential changes in some blood components in the normal neonatal calf. *Br Vet J* 1978; **134:**590-597
- Mendelsohn D, Levin NW: The estimation of total body water using a colorimetric method for the determination of antipyrine (1, 5-dimethyl-2-phenyl-3-pyrazolone) in plasma. *J Lab Clin Med* 1959; **54:**311-9.
- Michell AR, Brooks HW, White DG, Wagstaff AJ: The comparative effectiveness of three commercial oral rehydration solutions in correcting fluid, electrolyte and acid-base disturbances caused by calf diarrhoea. *Br Vet J* 1992; **148:**507 - 522.
- Michell AR, Grove-White DH: Comparison of the measurement of total carbon dioxide and strong ion difference for the evaluation of metabolic acidosis in diarrhoeic calves. *Vet Record* 2001; **148:**368-370

Milla PJ: Disorders of electrolyte absorption. *Clin Gastroenterol*, 1982; vol.11, no.1

Möllenberg L, Ekman L, Jacobsson S: Plasma and blood volume in calf from birth till 90 days of age. *Acta Vet Scand* 1975; **16**:178-185

Montner P, Stark DM, Riedesel ML, Murata G, Robergs RA, Timms M, Chick TW: Pre-exercise glycerol hydration improves cycling endurance time. *International Journal of Sports Medicine* 1996; **17**:27-33

Monter P, Stark DM, Riedesel ML et al: Pre exercise glycerol hydration improves cycling endurance time. *Int J Sports Med* 1996; **17(1)**:27-33

Moore R, Tzipori S, Griffiths JK, Johnson K, De Montovny L, Pomakána I: Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 1995; **108 (4)**: 1030-9

Morris RJH, Howard B, Macfarlane WV: Interaction of nutrition and air temperature with water metabolism of Merino wethers shorn in winter. *Aust J Agric Res* 1962; **13(2)**:320 – 334

Mulrow PJ, Oestreich HM, Swan RC: Measurement of Extracellular Fluid Volume of Nephrectomized Dogs With Mannitol, Sucrose, Thiosulfate and Radiosulfate. *Am J Physiol* 1956; **185**:179-184

Naylor JM, Petrie L, Rodriguez MI, Skilnick P: A comparison of three oral electrolyte solutions in treatment of diarrheic calves. *Can Vet J* 1990; **31**:753-60

Naylor JM: Oral electrolyte therapy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1999; **15 (3)**: 487-504

Newman EV, Gilman A, Philips FS: The renal clearance of thiosulfate in man. *Bull. Johns Hopkins Hospital* 1946; **79**:229

- O'Donoughe PJ: Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1955; **25(2)**:139-95
- O'Loughlin EV, Scott RB, Gall DG: Patophysiology of infectious diarrhea: changes in intestinal structure and function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; **12(1)**:5-20
- Pace N, Rathbun EN: Studies of body composition. III. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *J Biol Chem* 1945; **158**:685-691
- Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM: Cryptosporidial infection in calf. *Vet Pathol* 1971; **8**: 479-84
- Pavlásek I: First record of Cryptosporidium sp. oocysts in calves in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)* 1981; **28**: 187-89
- Payne E, Ryley JW, Gartner RJW: Plasma blood and extracellular fluid volume in grazing Hereford cattle. *Res Vet Sci* 1967; **8**:20-26
- Pelkonen R, Nikkila EA, Kekki M. Metabolism of glycerol in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1967; **3**:1-8
- Persson SGB, Ullberg LE: Blood volume determination with Evans blue dye in foals. *Acta Vet Scand* 1979; **20**:10-15
- Phillips RW, Lewis LD, Knox KL: Alterations in body water turnover and distribution in neonatal calves with acute diarrhea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1971; **76**:231-43
- Phillips RW, Lewis LD: Viral induced changes in intestinal transport and resultant body fluid alterations in neonatal calves. *Ann Rech veter* 1973; **4**: 87-98.
- Prentice TC, Siri W, Berlin NI, Hyde GM, Parsons RJ, Joiner EE, Lawrence JH: Studies of total body water with tritium. *J Clin Invest* 1952; **31(4)**:412-418

- Quigley JD, Drewry JJ, Martin KR: Nutrition, feeding and calves: Estimation of plasma volume in holstein and jersey calves. *J Dairy Sci* 1997; **81**:1308-1312
- Quilez J, Sanchez-Acedo C, Clavel A, del Cacho E, Polez-Bernad F: prevalence of Cryptosporidium infections in pigs in Aragon (northeastern Spain). *Vet Parasitol* 1996; **67 (1-2)**: 83-8
- Raisz LG, Young MK Jr, Stinson IT: Comparison of the volumes of distribution of inulin, sucrose and thiousulfate in normal and nephrectomized dogs. *Am J Physiol* 1953; **174(1)**:72-78
- Riedesel ML, Allen DY, Peake GT, Al-Qattan K: Hyperhydration with glycerol solutions. *J Apply Physiol* 1987; **63 (6)**:2262-2268
- Robergs RA, Griffin SE: Glycerol: Biochemistry, Pharmacokinetics and Clinical and Prastical Applications. *Sports Med* 1998; **26(3)**:145-167
- Ross JG, Preston RL, Bartle SJ: Evaluation of Sodium Thiosulfate as an Extracellular Water Marker in Cattle. *J Anim Sci* 1992; **70**: 434-438
- Roy JHB: The calf-5th ed. Vol. 1: Management of Health 1990, *Butterworths*, 258 s.
- Saitoh T, Kokue E, Shimoda M: The impact of acute phase response on the plasma clearance of antipyrine, theophylline, phenytoin and nifedipine in rabbits. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; **23**:153-158
- Scheett TP, Webster MJ, Wagner KD: Effectiveness of glycerol As a Rehydrating Agent. *Int J Sport Nutrition and Excercise Metabolism* 2001; **11**: 63-71
- Schenck M, Kolb E: Základy fyziologickej chémie. 1. vydání, *Príroda*, Bratislava, 1991, 648 s.
- Simmons RD, Bywater RJ: Oral rehydration in the management of neonatal diarrhea in livestock. *Comp Contin Ed Vet Pract* 1991; **13**: 345-350.

Slanina L, Dvořák R a kol.: Veterinárna klinická diagnostika vnútorných chorob. *Príroda*, Bratislava, 1993, 389 s.

Slanina L a kol.: Zdravie a produkcia teliat, *Príroda*, Bratislava, 1991

Slavin D: *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.). *J Comp Pathol* 1955; **65**:262-6

Snyder SP, England JJ, McChesney AE: Cryptosporidiosis in imunodeficient Arabian foals. *Vet Pathol* 1978; **15**(1): 12-17

Soberman R., Brodie BB, Levy BB, Axelrod J, Steele JM: The use of antipyrine in the measurement of total body water in man. *J Biol Chem* 1949; **179**:31-42

Sommer S, Nau R, Wieland E, et al. Pharmacokinetics of glycerol administered orally in healthy volunteers. *Arzneimittel Forschung* 1993; **43**(7):744-7

Spensley MS, Carlson GP, Harrold D: Plasma, red blood cell, total blood and extracellular fluid volumes in healthy horse foals during growth. *Am J Vet Res* 1987; vol. 48, no. 12

Ternouth JH: Changes in the thiosulphate space and some constituents of the blood of sheep after feeding. *Res Vet Sci* 1968; **9**:345-349

Thompson RCA: Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Parasitol* 2003a; **89**:S134-S140

Thompson RCA: The zoonotic potential of *Cryptosporidium*. In: *Cryptosporidium from molecules to disease*. 2003b (Thompson RCA, Armson A, Morgan-Ryan UM, eds), pp. 113-119. *Amsterdam Elsevier*

Thorton BJ, English PB: Body water of calves: Change in distribution with diarrhea. *Br Vet J* 1978; 134: 445-452

Till AR, Downes AM: The measurement of total body water in the sheep. *Aust J Agric Res* 1962; **13(2)**:335 – 342

Tourtellotte WW, Reinglass JL, Newkirk TA. Cerebral dehydration action of glycerol. *Clin Pharmacol Ther* 1972; **13**:159-71

Tyzzer EE: *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd* 1912; **26**: 394-412

Tzipori S: Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev* 1983; **47**: 84-96

Vajda V: Mliečna výživa a využitelnost živin u klinicky zdravých a hnačkujících teliat. *Vet Med (Praha)* 1991; **36(8)**:449-58

Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**:72-97

<http://members.aol.com/Bio50/LecNotes/lecnot20.html>

10. Příloha

Tab 5. Intenzita průjmu (%) – podíl vody ve výkalech

Tele/DPI	3	4	5	6	7	8	9	10
22/K	90,14	92,45	91,89	81,61	80,28	97	81,48	82,61
53/K	86,62	75,95	75,92	71,05	77,42	83,70	33,33	87,5
57/K	90,80	89,23	78,95	75,86	77,22	97	88,12	95,16
33/K	81,58	79,25	88,37	-	96,47	98	97,26	97,64
34/K	89,09	81,48	90	84,31	100	100	95	94,78
36/K	89,09	81,48	90	84,31	100	100	95	94,78
56/G	72	75,81	83,82	72,60	81,90	74,12	75,36	87,88
59/G	69,86	72,88	94,74	78,57	-	97	88,14	-
31/G	72,73	87,5	84,13	77,08	95,92	95	93,92	97
35/G	78,69	87,78	90	83,33	-	100	98	96,15
37/G	97,87	95,74	95,45	90,74	91,89	95,45	94,49	92,81
38/G	49,58	96,88	92,73	91,59	98,36	95,69	96,21	97,22

Tab. 6 Hodnoty pro graf pH krve

	1 DPI		6 DPI	
<i>pH</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	7,403	7,395	7,42	7,434167
SD	0,023	0,016	0,03511885	0,027901
SD/2	0,012	0,008	0,01755942	0,013951

Tab. 7 Hodnoty pro graf parciálního tlaku CO₂

	1 DPI		6 DPI	
<i>CO₂</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	6,717	6,850	6,641667	7,05
SD	0,384	0,242	0,390957	0,416333
SD/2	0,192	0,121	0,195478	0,208167

Tab. 8 Hodnoty pro graf parciálního tlaku O₂

	1 DPI		6 DPI	
O ₂	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	4,958	4,758	4,875	4,683333
SD	1,052	0,586	1,006127	1,093415
SD/2	0,526	0,293	0,503064	0,546707

Tab. 9 Hodnoty pro graf BE

	1 DPI		6 DPI	
BE	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	6,642	5,392	7,65	9,616667
SD	1,727	2,004	2,157352	2,22723
SD/2	0,863	1,002	1,078676	1,113615

Tab. 10 Hodnoty pro graf množství HCO₃⁻

	1 DPI		6 DPI	
HCO ₃ ⁻	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	29,883	28,792	30,95	31,96667
SD	1,526	1,692	2,120927	1,91304
SD/2	0,763	0,846	1,060464	0,95652

Tab. 11 Hodnoty pro graf saturace krve

	1 DPI		6 DPI	
saturace	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	67,417	66,025	67,43333	65,08333
SD	13,820	7,830	13,55079	16,21554
SD/2	6,910	3,915	6,775395	8,107772

Tab. 12 Hodnoty pro graf celkového CO2

CO2	1 DPI		6 DPI	
	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>	<i>kontrola</i>	<i>glycerol</i>
průměr	34,158	33,017	34,975	37,075
SD	0,987	1,735	1,438967	1,841139
SD/2	0,493	0,868	0,719483	0,920569

Tab. 13 Hodnoty pro graf objemů tělních tekutin

	Objem krevní plazmy		Objem plné krve		Objem extracelulární tekutiny		Objem celkové vody	
	<i>Kontrola</i>	<i>Glycerol</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Glycerol</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Glycerol</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Glycerol</i>
průměr	7,09	8,10	8,95	10,80	32,38	37,02	73,25	78,23
SD	12,22145	10,47405	6,544498	17,83319	1,667701	3,309411	6,055204	5,042047
SD/2	0,611073	0,523703	0,327225	0,89166	0,833851	1,654705	3,027602	2,521023