

THE EFFECT OF PERORAL REHYDRATION WITH A GLYCEROL CONTAINING SOLUTION ON ACIDBASE BALANCE AND HYDRATATION STAGE IN *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* INFECTED CALVES.

VLIV PERORÁLNÍHO REHYDRATAČNÍHO ROZTOKU S OBSAHEM GLYCEROLU NA HYDRATAČNÍ STAV A ACIDOBÁZICKOU ROVNOVÁHU U TELAT EXPERIMENTÁLNĚ INFIKOVANÝCH *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Lelková H., Šoch M., Klein P.

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice;

Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 01 Praha-Uhřetěves, Česká republika

E-mail: hanuscha@seznam.cz, soch@zf.jcu.cz, klein.pavel@vuzv.cz

ABSTRACT:

Diarrhea in neonatal calves belongs one of to the most frequent health complications in cattle breeding. In symptomatic therapy of diarrhea, rehydrating solutions (RS) to prevent dehydration, loss of ions and energy, and metabolic acidosis, are used. The aim of this experiment was to evaluate glycerol as a part of RS for neonatal calves with enteritis. Total of 12 neonatal Holstein calves were experimentally infected with 10^7 oocysts of *C. parvum*. A day 4.5 p.i., when the symptoms of disease occurred, they were randomly divided into 2 groups and for 3.5 days (7 feedings) only fed RS instead of milk. The composition of RS and dosages (55 mL/kg of BW) were the same for both groups, except that experimental group had their RS enriched with glycerol (1g / kg of BW). The highest concentration of oocysts was observed between 6th and 8th day p.i. Diarrhoea occurred 3-4 days p.i. in all of calves. In both groups, feeding with RS resulted in regression of diarrhoea and abnormal increase of oocysts concentration in faeces. Parametres of acid-base balance were unaffected by the glycerol treatment, but volumes (% from BW) of blood plasma, whole blood, extracellular fluid and total body water were higher in treated animals (8.09 vs. 7.09, NS; 10.79 vs. 8.95, $p > 0.05$; 37.02 vs. 32.38, $p > 0.05$ and 78.23 vs. 73.25; $p > 0.05$, respectively). These results suggest that orally administered glycerol effectively facilitates water retention and can be used as a component of RS for diarrheal calves.

Keywords: diarrhoea, calves, rehydration solution, glycerol, acid-base balance, body fluid volume

ABSTRAKT

Průjemová onemocnění novorozených telat patří mezi nejčastější problémy v chovech skotu. V symptomatické terapii průjmů se uplatňují rehydratační roztoky (RR), zabraňující

dehydrataci, ztrátám iontů a energie a metabolické acidóze. Cílem experimentu bylo vyhodnotit účinek glycerolu jako součást RR pro novorozená telata s enteritidou. Celkem 12 novorozených holštýnských telat bylo experimentálně infikováno 10^7 oocyst *C. parvum*. Ve 4,5 dnu p.i., v době výskytu symptomů onemocnění, byla telata náhodně rozdělena do 2 skupin a 3,5 dne (7 krmení) krmena pouze RR. Složení RR a jejich dávkování (55 mL/kg ž.hm.) bylo u obou skupin stejné, u pokusné skupiny byl RR obohacen o glycerol (1g/kg ž.hm.). Nejvyšší koncentrace oocyst ve výkalech byly zjišťovány mezi 6. a 8. dnem p.i. Průjem se vyskytl u všech telat 3.-4. den p.i. V průběhu podávání RR došlo u obou skupin k ústupu průjmu a abnormálnímu zvýšení počtu oocyst ve výkalech. U obou skupin nebyly v době rehydratační terapie ovlivněny parametry acidobazické rovnováhy, avšak objemy krevní plazmy, celkové krve, extracelulární tekutiny a celkové vody v těle byly vyšší u telat, jež měla RR obohacený glycerolem (8.09 vs. 7.09, NS; 10.79 vs. 8.95, $p > 0.05$; 37.02 vs. 32.38, $p > 0.05$ a 78.23 vs. 73.25; $p > 0.05$). Z výsledků vyplývá, že orálně podaný glycerol usnadňuje zadržování vody v těle a může být účinným doplňkem RR pro průjmující telata.

Klíčová slova: průjem, telata, rehydratační roztok, glycerol, acidobazická rovnováha, objemy tělních tekutin

ÚVOD

Průjmová onemocnění telat patří stále mezi nejzávažnější zdravotní a ekonomické problémy v chovech skotu. Průjmy způsobují jak přímé ztráty, tak zejména nepřímé v podobě nižší užitkovosti nemocných zvířat a zvýšených nákladů na jejich péči a na organizační a zoohygienická opatření. Nejčastější příčinou vzniku průjmů 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 *E.coli*, *Cryptosporidium parvum*, rotaviry, koronaviry a BVD virus.

SYMPTOMATICKÁ TERAPIE PRŮJMŮ

Riziko větší ztráty elektrolytů a vody v průběhu průjmu je u telat mimořádně vysoké. Průměrné ztráty vody střevem se pohybují kolem 2 litrů za den, ale rozmezí je mezi 1 až 6 litry denně. Toto má za následek celkovou dehydrataci. Ztráty sodíku u průjmujících telat jsou větší než draslíku. 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 (Naylor, 1999).

Nejdůležitější místo v symptomatické terapii průjmů, dehydratace a acidózy proto mají rehydratační roztoky (RR), které organismu telat doplňují vodu, energii a elektrolyty (Acra et Ghishan, 1996). Rehydratační roztoky také umožňují odpočinek střeva od trávení potravy a podporují tak i rychlejší obnovu destruovaného střevního epitelu.

Perorální rehydratační terapie zahrnuje užití roztoků s obsahem elektrolytů při dehydrataci organismu a udržení hydratačního stavu v průběhu průjemových onemocnění (*Acra et Ghishan, 1996*). Zásady péče o telata s průjemovým onemocněním a rehydratační terapie shrnul Naylor (1999). Pro zlepšení vstřebávání elektrolytů se do roztoků přidávají 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 vysoce energetický 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 milimolů 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.

Roztoky lze podávat orálně nebo intravenózně. Intravenózně se aplikuje vysoce dehydratovaným telatům, které mají díky dehydrataci organismu ochromený sací reflex (*Garcia, 1999*).

Glycerol

Jedním z nejúčinnějších rehydratačních činidel je glycerin. Efektivita jeho využití byla testována především ve sportovní medicíně (*Scheett et al, 2001*). Glycerin je hyperhydratační činidlo: přes vodík poutá molekulu vody a udržuje 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*). 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 přidávkou glycerinu podporují rychlejší a kompletnější obnovu množství vody v těle po akutní dehydrataci než roztoky bez glycerinu (*Scheett, 2001*).

Dle našich poznatků nebyl glycerin použit jako součást RR pro pacienty trpící průjmami.

Možnosti zjišťování hydratačního stavu

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

voda obsažená v krevní plazmě

extracelulární voda

intersticiální voda

intracelulární voda

Aktuální hydratační stav organismu lze *in vivo* sledovat pomocí dilučních metod, kdy je sledována velikost distribučního prostoru vhodného markeru. Pro měření objemu tělních tekutin jsou takovými markery thiosíran sodný (TS), antipyrin (AP) a Evansova modř (EM).

Thiosíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Měření distribučního prostoru thiosíranu sodného (TS) 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 (*English, 1966*). 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 vzorky ihned zamrazit. První clearance se objevuje u skotu již po 10-ti minutách (*Dalton, 1961; Ross et al, 1992*). Ross et al (1992) zjistili první clearance z krevní plazmy býků během 15-20 min.

Evansova modř ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$)

Evansova modř (EM) je netoxické nepyrogenní barvivo chemicky spadající mezi diazoniové soli. Tvoří pevný komplex s plazmatickými bílkovinami, zejména albuminem. Evansovu modř lze proto aplikovat intravenózně a tak dobře využít pro měření objemu krve a krevní plazmy *in vivo*, neboť její distribuční prostor odpovídá dosti přesně objemu krevní plazmy (*Quigley et al, 1997*). Její koncentraci lze v odstředěné plazmě zjistit poměrně snadno spektrofotometricky. Krev se smísí s barvivem během 10-15 minut po intravenózní aplikaci (*Ross, 1992*).

Antipyrin (1,5-dimethyl-2-phenyl-3-pyrazolon)

Antipyrin (AP) byl shledán jako vhodný marker pro měření objemu celkové vody v těle jak u lidí, tak i u zvířat (*English, 1966*). U telat lze tedy měřit objem celkové vody pomocí distribučního prostoru antipyrinu v krevní plazmě (*Thornton et English, 1978*). Objemy získané pomocí antipyrinu jsou v souladu s výsledky získanými měřeními pomocí „těžké vody“ - oxidem deuteria (D_2O) nebo tritiové vody (THO) (*English, 1966*).

Klinický průběh kryptosporidiózy u telat

Ke kryptosporidióze jsou nejvímavější telata ve věku 1-2 týdny a infekce je u nich lokalizována 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*). Na vzniku průjmu v průběhu kryptosporidiózy u lidí se podílí i zvýšení střevní propustnosti (*Moore et al, 1995*).

Cílem experimentu proto bylo ověřit možnost použití glycerinu jako součást RR pro novorozená telata s infekčním průjmovým onemocněním. Jako modelová nákaza byla zvolena kryptosporidióza, která je jedním z nejzávažnějších infekcí způsobujících průjmy u telat v časně postnatálním období.

MATERIÁL A METODY

Podmínky experimentu

Do pokusu bylo zařazeno 12 novorozených býčků holštýnského plemene ve věku od 1 do 5 dnů, experimentálně infikovaných dávkou 10×10^6 oocyst *C. parvum* (genotyp-2,

VUZV-N). Telata byla náhodně rozdělena do dvou skupin po šesti. Byla ustájena individuálně v polypropylenových kotcích na slámové podestýlce, která byla denně měněna.

K průběžné desinfekci kotců a kbelíků byl používán 1% ajatin a povrchy stáje byly ošetřovány 7% peroxidem vodíku. 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.

Dieta

3 dny po narození telata přijímala mlezivo a postupně byla převáděna na MKS (*Telasan-AA, Bodit, Tachov, ČR*).

Od 4,5 do 7 dne p.i., tedy v době vrcholení symptomů, telata přijímala RR 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 RR obohacený o glycerin v množství 1 g / kg ž. hm.

Voda byla k dispozici *ad libitum*.

Koprologická vyšetření

Intenzitu průjmu jsme hodnotili 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.

K parazitologickým analýzám jsme vzorky rovněž odebírali denně, vždy v ranních hodinách. 50-80 mg vzorku jsme přenesli do 5 ml zkumavky a doplnili deionizovanou vodou na 1 ml. Vzorek jsme zhomogenizovali na třepačce a doplnili 2 ml podchlazeného petrolétheru a opět protřepali. Zkumavku jsme doplnili do 4 ml deionizovanou vodou a odstředili (3500 ot./min., 4°C, na 10 minut) Po odstranění supernatantu jsme sediment doplnili vodou, aby výsledný objem ve zkumavce byl 1 ml. Po důkladném promíchání na třepačce jsme mikropipetou kápeli 40 µl suspenze na podložní sklo a kapku špičkou mikropipety rozetřeli 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 jsme skvrnu fixovali metanolem v plameni a sklíčko ponořili na 10 min. do roztoku karbol-fuchsínu dle Ziehl-Neelsena. Po opláchnutí vodou byl preparát odbarven 3% roztokem HCl v 95% denaturovaném etanolu po dobu 20-80 sekund.

Preparát jsme znovu opláchli vodou a ponořili na 30-50 sekund do 1% roztoku metylénové modři pro dobarvení pozadí. Po opláchnutí vodou a oschnutí jsme preparát překryli krycím sklíčkem na kapce imerzního oleje a hodnotili 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 250x 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)

Rozbory 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 RR za použití markerových metod (EM, AP, TS) bylo provedeno měření objemu tělních tekutin.

Odběry vzorků krve pro zjištění parametrů acidobazické rovnováhy

Odběr krve jsme provedli 2. a 6. den p.i. v ranních hodinách, nalačno. Vzorky jsme odebrali z v. *jugularis* do heparinizovaných kapilár, uložili na ledovou tříšť a ihned odvezli na analýzu dle Astrupa.

Měření objemu krevní plazmy a krve

Vlastní měření objemu krve resp. krevní plazmy jsme uskutečnili vždy 3. den od zahájení 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 jsme zahájili vždy 10 minut po přijetí odměřené dávky rehydratačního roztoku. Po aplikaci roztoků TS, AP a EM jsme telatům v pravidelných intervalech 10, 20, 30, 60, 120, 180 a 240 minut odebírali vzorky krve z protilehlé v. *jugularis*, přenesli do heparinizovaných zkumavek a odstředili. Koncentraci barviva jsme zjišťovali v odstředěné plazmě. Současně jsme z každého odběru odebrali i vzorek pro stanovení hematokritu.

Pro stanovení markerů v krevní plazmě jsme zvolili spektrofotometrické metody

Stanovení thiosíranu sodného (Ross et al, 1992)

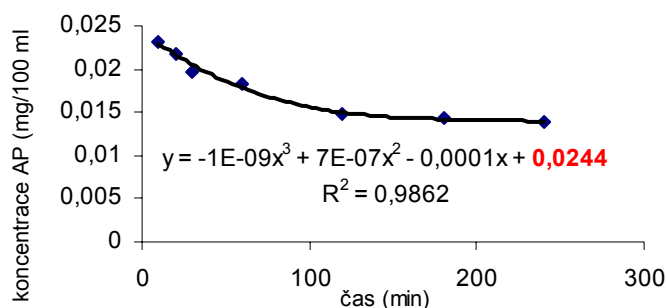
500 μ l vzorku / standardu jsme deproteinovali 2 ml 8% kys.trichloroctové, vzorek důkladně protřepali na vortexu a 15 minut odstředili (1500g / 4°C). K 1 ml supernatantu jsme přidali 500 μ l 8% roztoku Na_3PO_4 a 500 μ l jodového činidla (0,0005 M I_2 v 1 litru 1 M roztoku KI), roztok promíchali a ponechali 30 minut při laboratorní teplotě reagovat. Poté byly k roztoku přidány 2 ml H_2O . Absorbanci jsme změřili při $\lambda = 350$ nm proti slepému vzorku. Slepé vzorky i standardní roztoky jsme připravili stejným způsobem, vč. deproteinace kys.trichloroctovou.

Stanovení antipyrinu (Greenblatt & Locniskar, 1979)

K 1 ml plazmy jsme přidali 1 ml H_2O a 1 ml zinečnatého činidla (100 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 40 ml 3 M H_2SO_4 doplněno do 1 l destil. vodou). Za stálého míchání jsme k této směsi po kapkách přidávali 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 jsme odebrali a zředili vodou 1:1, poté přidali 20 μ l 2 M H_2SO_4 a změřili absorbanci při 350 nm. Kyvety jsme ponechali v karuselu spektrofotometru a ke každému vzorku přidali 40 μ l 0,2% NaNO_2 . Přesně po 20 minutách jsme znovu při 350 nm zjistili absorbanci. Koncentraci antipyrinu ve vzorku jsme zjistili z rozdílu absorbancí před a po přidání NaNO_2 .

Protože koncentrace AP a TS v čase dosti prudce klesá (= clearance) a my jsme uskutečnili první měření až v 10. minutě, bylo potřeba křivku extrapolovat do času 0. Z této koncentrace AP resp. TS v čase 0 jsme vypočítali objem celkové vody resp. extracelulární tekutiny. Pro všechny křivky vyhovoval jako model polynom 3. stupně $(y = ax^3 + bx^2 + cx + d)$, kde d je hledanou koncentrací v čase 0. Distribuční prostor markeru byl vypočten ze směšovací rovnice, přičemž koncentrace markeru v krvi před jeho podáním byla uvažována jako nulová.

Graf 1 : Příklad eliminace AP u jednoho z telat (koncentrace $AP_0 = 0,0244$ mg/100 ml)



Stanovení koncentrace Evansovy modři

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

Vzorky plazmy jsme před vlastním stanovením ředili 1: 0,5 fyziologickým roztokem a krátce odstředili. Vlastnímu stanovení předcházely analýzy 8 vzorků plazem odebraných telatům stejného věku. Všechny vzorky byly negativní na přítomnost EM. Hodnoty absorbance při 740 nm jsme vynesli v grafu na osu x, hodnoty absorbance při 620 na osu y a vypočítali jsme regresi:

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

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 sestrojena 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) jsme vypočítali 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) jsme vypočítali podle rovnice:

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

kde: H ... hodnota hematokritu

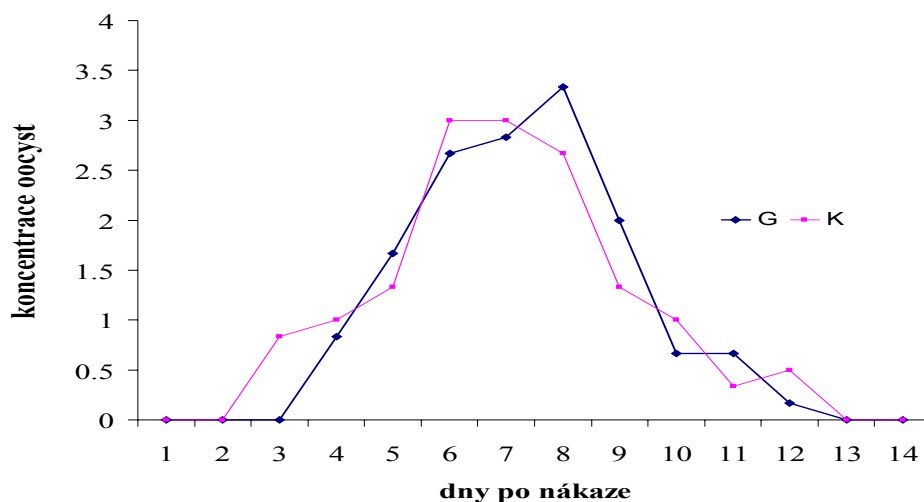
VÝSLEDKY

Klinický průběh onemocnění

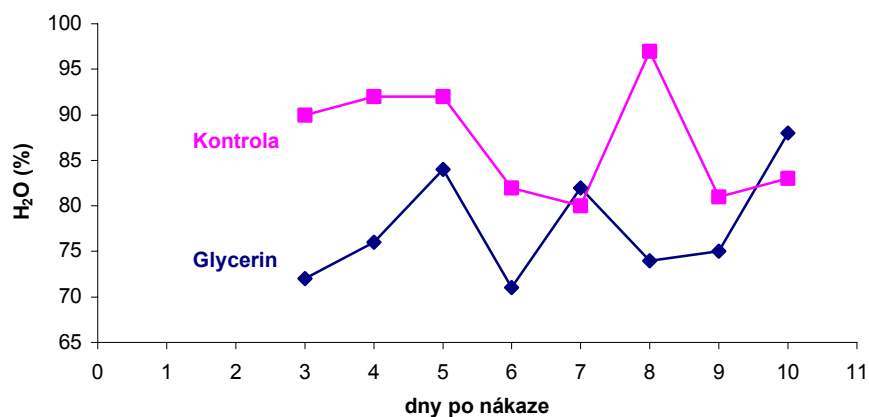
Tab.2: Koncentrace oocyst ve výkalech infikovaných telat (počet křížků vyjadřuje ve 4-bodové stupnici koncentraci oocyst, číslo v závorce udává průměrný počet oocyst v zorném poli při 250x zvětšení)

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

Graf 2. Vylučování oocyst ve výkalech

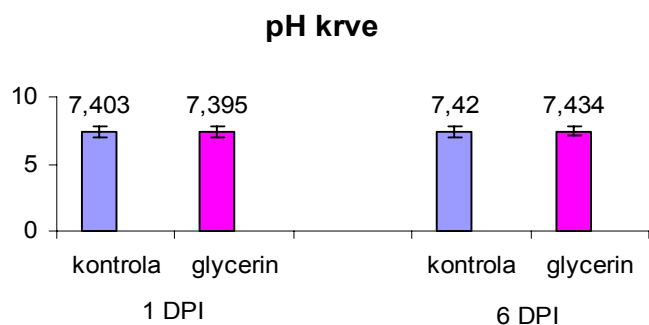


Graf 3. Zastoupení vody ve výkalech (%)

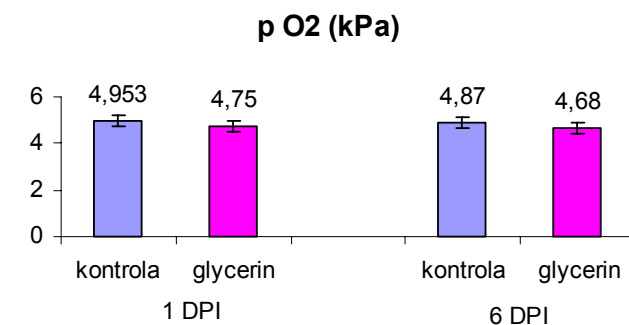


Graf 4-10: Parametry acidobazické rovnováhy krve v 1. a 6. dnu po infekci (DPI)

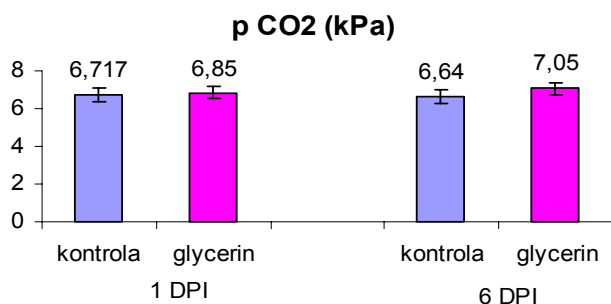
Graf 4. pH krve



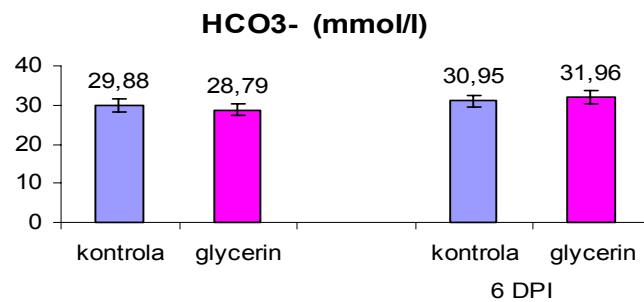
Graf 5. parciální tlak O_2 (kPa)



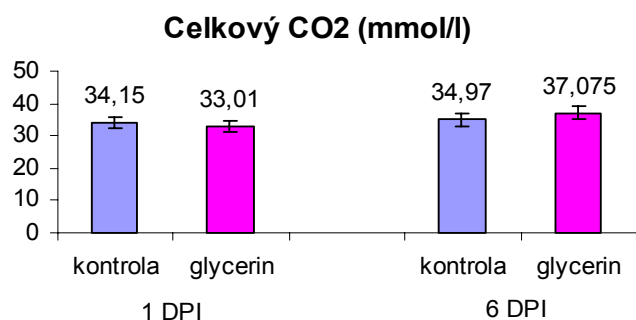
Graf 6. Parciální tlak CO_2 (kPa)



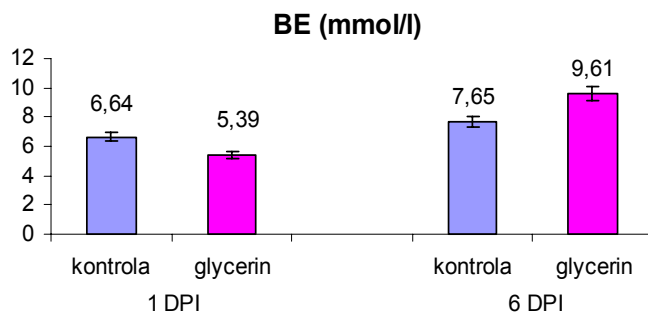
Graf 7. Koncentrace HCO_3^- (mmol/l)



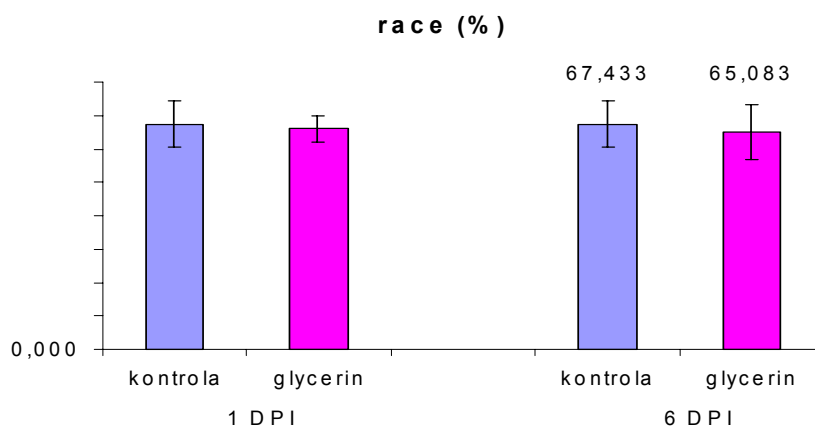
Graf 8. Celková koncentrace CO₂ (mmol/l)



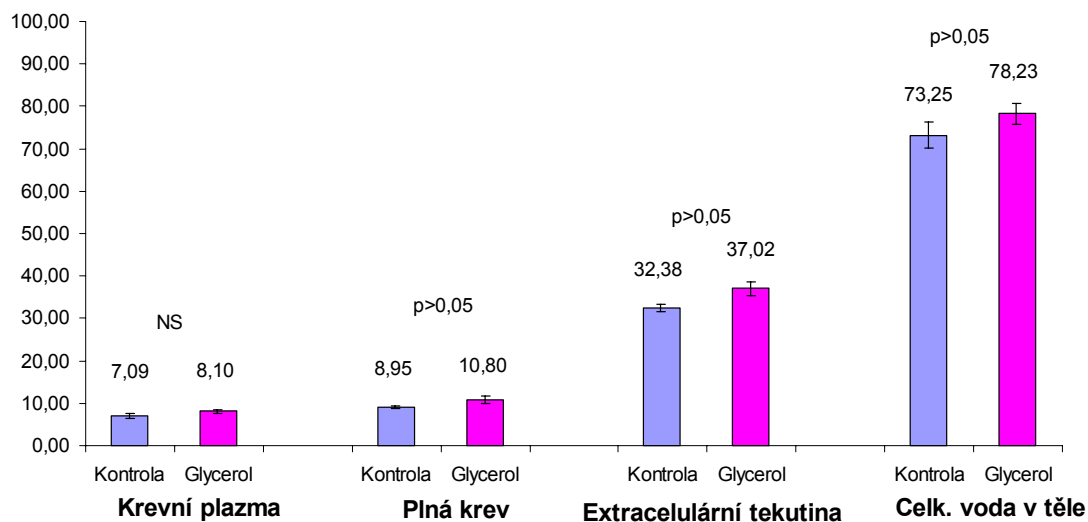
Graf 9. Celková koncentrace zásad (mmol/l)



Graf 10. Saturace krve kyslíkem (%)



Graf 11. Vliv podávání glycerolu na změny objemu tělních tekutin



DISKUZE

Z výsledků rozborů krve na parametry acidobazické rovnováhy plyne, že v průběhu rehydratační terapie byl ovlivněn pouze 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 nevykazují signifikantní rozdíly ani u jedné skupiny. pH krve obou skupin telat se pohybovalo ve fyziologickém rozmezí 7,36 – 7,43 (*Slanina, 1991*). Parciální a celkový tlak CO_2 vykázal signifikantní změnu mezi skupinami v 6. dnu p.i. Nad referenční hodnotou je 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), a proto lze usuzovat na lehkou metabolickou alkalózu. Rozdíly mezi těmito parametry však nebyly statisticky významné. Saturace krve kyslíkem odpovídá referenčnímu rozmezí pro venózní krev, stejně tak i parciální tlak kyslíku. Z těchto výsledků tedy plyne, že glycerol v RR neměl prokazatelný vliv na parametry acidobazické rovnováhy ani sycení krve kyslíkem.

Z výsledků měření objemů tělních tekutin však vyplývá, že u pokusné skupiny došlo po přijetí stejné dávky RR k jejich navýšení. Rozdíl v množství krevní plazmy se ukázal u obou skupin 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. Výsledky pokusu naznačují, že glycerol dosti snadno a rychle proniká do všech tělesných kompartmentů, ve kterých díky svým vlastnostem efektivně zadržuje vodu. Tento pozitivní efekt je 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*).

ZÁVĚR

Z výsledků pokusu vyplývá, že glycerin podávaný v dávce 1 g / kg ž.hm. efektivně napomáhá zadržování vody v těle a může být vhodným doplňkem RR pro telata s průjmovými onemocněními.

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

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

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.

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

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

Roy JHB: The calf-5th ed. Vol. 1: Management of Health 1990, Butterworths, 258 s.

Scheett TP, Webster MJ, Wagner KD: Effectiveness of glycerol As a Rehydrating Agent. *Int J Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2001; **11**: 63-71

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

Ross JG, Preston RL, Bartle SJ: Evaluation of Sodium Thiosulfate as an Extracellular Water Marker in Cattle. *J Anim Sci* 1992; **70**: 434-438

English PB: A study of water and elektrolyte metabolism in Sheep- II- The volumes of distribution of Antipyrine, Thiosulphate and T1824 (Evans Blue) and values for certain extracellular fluid constituents. *Res Vet Sci*, 1966; **7**: 258-275

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Michell AR, Brooks HW, White DG, Wagstaff AJ: The comparative effectiveness of three commercial oral solutions in correcting fluid, electrolyte and acid-base disturbances caused by calf diarrhoea. *Br Vet J*. 1992;**148(6)**:507-22

Lyons TP, Riedesel ML, Meuli LE, Chick TW: Effects of glycerol-induced hyperhydration prior to exercise in the heat on sweating and core temperature. *Med Sci Sports Exerc* 1990; **22**:477-483

Quigley JD, Drewry JJ, Martin KR: Estimation of plasma volume in Holstein and Jersey calves. *J Dairy Sci* 1997; **81**:1308-1312

Úkol byl řešen za finanční podpory MZe ČR (projekt MZe-000 270 1403).