

# ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

## FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

KAROLÍNA  
SEJKOROVÁ



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství**

**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi**

**Possibilities of the Veterinary Diagnostics in the Laboratory Practice**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MVDr. Ján Švalec

**Karolína Sejkorová**

**Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e**

Student: **Karolína Sejkorová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi**  
Téma anglicky: Possibilities of the Veterinary Diagnostics in the Laboratory Practice

**Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :**

Předmětem bakalářské práce bude měření veterinárních vzorků na analyzátoru Immulite 1000 a u progesteronu porovnání metod stanovení humánních (Abbott Architect) a veterinárních (Siemens Immulite) diagnostik.

Laboratorní diagnostika představuje ve veterinární medicíně klíčovou roli ve stanovení přesné diagnózy a odpovídající léčbě. Veterinární analyzátor Immulite 1000 na našem pracovišti zpracovává a vyhodnocuje výsledky štítné žlázy, pankreasu i pohlavních hormonů. Na základě změny koncentrace progesteronu během jednotlivých fází pohlavního cyklu u samic, se v této bakalářské práci zaměříme právě na stanovení sérového progesteronu samic. Vyšetření koncentrace sérového progesteronu u zvířat hraje důležitou roli pro zjištění doby pohlavního cyklu samic i stanovení optimální doby krytí samcem. Jednou z příčin nezabřeznutí samice může být nevhodně zvolený den krytí. U některých samic se častěji vyskytuje méně typický průběh říje a v mnoha případech jsou zevní příznaky říje tak nevýrazné, že průměrný chovatel optimální den krytí neodhadne. Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na přesnou charakteristiku jednotlivých fází pohlavního cyklu samic, jejich řízení a ovlivnění ostatními pohlavními hormony. V praktické části bakalářské práce si student vyzkouší samotné měření sérového progesteronu na různých analyzátoch, zpracuje jejich výsledky a vyhodnotí případné rozdíly v měření.

**Seznam odborné literatury:**

- [1] ZIMA, Tomáš, Laboratorní diagnostika, ed. 3., dopl. a přeprac. vyd., Praha: Galén, c2013, ISBN 978-80-7492-062-2  
[2] TOMAN, Miroslav, Veterinární imunologie, ed. 2., dopl. a aktualiz. vyd., Praha: Grada, 2009, ISBN 978-80-247-2464-5  
[3] Masopust J., Doležalová V., Základy imunochemických vyšetřovacích metod, Informační služba SEVAC Praha, vydání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: MVDr. Ján Švalec  
Konzultant: Ing. Lubica Gelieňová

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 31.10.2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 15.05.2017

.....  
Karolína Sejkorová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda v první řadě poděkovala MVDr. Jánovi Švalecovi za odborné vedení této závěrečné práce. Děkuji mu za jeho cenné rady, trpělivost, ochotu aktivně řešit veškeré komplikace, které v průběhu tvorby práce vznikaly, za jeho cenný čas a vždy vřelý lidský přístup. Velké poděkování též náleží vedení laboratoře Jankovcova společnosti Synlab czech s.r.o. za umožnění realizace této práce, dále také zaměstnancům laboratoře za předání svých praktických zkušeností a vědomostí, především pak Ing. Lubici Gelieňové. Poděkování také patří mé rodině i přátelům za veškerou podporu při mém studiu.

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se věnuje možnostem veterinární diagnostiky v laboratorní praxi, především rozpoznání plodné fáze hospodářsky významných samic vybraných druhů savců. Cílem teoretické části práce je uvedení možností veterinární diagnostiky v humánních i veterinárních laboratořích, dále charakteristika estrálních cyklů samic, nejdetailněji fen, jejich hormonálního řízení a možnosti detekce nejvhodnější doby pro krytí samcem. V dnešní době je nejpřesnější metodou detekce plodné fáze fen stanovení sérového hormonu progesteronu. Cílem praktické části je srovnání metod stanovení sérového progesteronu u fen na analyzátorech Abbott Architect i2000SR a Siemens Immulite 1000. Dílčím cílem praktické části je charakteristika metody stanovení chemiluminiscence a obou analyzátorů a statistické vyhodnocení získaných dat pro porovnání obou analyzátorů. V diskusi jsou zmíněny studie vypovídající o reprodukční úspěšnosti této metody.

## **Klíčová slova**

Veterinární diagnostika; progesteron; estrální cyklus; reprodukce fen; chemiluminiscence.

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the possibilities of veterinary diagnostics in laboratory practice, especially recognition of the fertile phase of economically significant females of selected mammalian species. The aim of the theoretical part is to introduce the possibilities of veterinary diagnostics in human and veterinary laboratories, as well as characteristics of estrous cycles of the female, the most details of bitches, their hormonal control and the possibility of detecting the most appropriate time for fertilization. Nowadays, the most accurate method of detecting the fertile phase of females is the diagnostic of serum hormone progesterone concentrations. The aim of the practical part is to compare methods of determination of serum progesterone in females on Abbott Architect i2000SR and Siemens Immulite 1000 analyzers. Next aim of practical part is a characteristic of the chemiluminescence determination method, of both analyzers and statistical evaluation of the obtained data for comparison of both analyzers. In the discussion are mentioned studies evaluating the reproductive usability of this method.

## **Keywords**

Veterinary diagnostics; progesterone; estrous cycle; reproduction of bitches; chemiluminescence.

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Současný stav řešené problematiky .....	11
2.1	Náhled do veterinární laboratorní diagnostiky .....	11
2.2	Estrální cyklus samic.....	13
2.3	Charakteristiky estrálního cyklu u vybraných druhů savců .....	15
2.3.1	Klisna.....	17
2.3.2	Dojnice .....	18
2.3.3	Prasnice.....	19
2.3.4	Ovce.....	20
2.3.5	Koza.....	21
2.3.6	Kočka.....	22
2.4	Charakteristika estrálního cyklu feny.....	23
2.4.1	Fáze estrálního cyklu .....	23
2.4.2	Hormonální řízení.....	26
2.5	Možnosti určení vhodné doby pro krytí feny .....	31
3	Cíl práce.....	35
4	Metodika .....	36
4.1	Chemiluminiscence .....	36
4.2	Abbott Architect i2000SR.....	37
4.3	Siemens Immulite 1000 .....	42
4.4	Definice souboru vzorků a jejich zpracování .....	48
4.5	Postup statistického zpracování výsledků.....	48



5	Výsledky.....	50
6	Diskuze.....	57
7	Závěr.....	62
8	Seznam použitých zkratk.....	63
9	Seznam použité literatury.....	66
10	Seznam použitých obrázků.....	70
11	Seznamu použitých tabulek.....	71
12	Seznam Příloh.....	72

# 1 ÚVOD

Možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi jsou značně obsáhlým tématem. Péče o hospodářsky významná i domácí zvířata je v dnešní Evropě na vysoké úrovni. Obdobně jako je tomu u humánní medicíny, i veterinární lékaři k diagnostice onemocnění zvířat využívají širokou škálu laboratorních stanovení. Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku reprodukce, konkrétně určení plodné fáze vybraných samic, především fen. Důvodem volby tématu byl osobní zájem autorky o automatizované i neautomatizované laboratorní veterinární stanovení v humánních laboratořích.

V teoretické části budou nastíněny možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi. Dalším cílem této části je podrobná charakteristika reprodukčních cyklů vybraných samic savců, nejpodrobněji fen, z důvodu pochopení důležitosti této diagnostiky i fyziologických pochodů v organismu samic důležitých pro správné vyhodnocení výsledků stanovení a určení jejich plodné fáze nejen laboratorními metodami.

V praktické části práce pak bude popsána metoda stanovení hladiny hormonu progesteronu, který je v současné době nejpřesnější metodou nejen pro určení vhodné doby krytí feny, ale i predikci porodu, čímž se výrazně navyšuje reprodukční úspěšnost chovu. Cílem práce bude také porovnání výsledků měření sérového progesteronu na analyzátoch Immulite 1000 od výrobce Siemens a Architect i2000SR od výrobce Abbott Laboratories. V diskusi budou zmíněny studie vypovídající o reprodukční úspěšnosti při použití metody stanovení sérového progesteronu fen, v určení plodné fáze i predikci porodu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Obdobně jako je tomu v humánní medicíně, je i ve veterinárním lékařství laboratorní diagnostika neodmyslitelnou součástí. Výsledky laboratorních vyšetření objektivizují a doplňují klinické nálezy a konkretizují diagnózu. [1]

### 2.1 Náhled do veterinární laboratorní diagnostiky

Praktikující veterinář stojí před rozhodnutím, zda testy provádět na svém pracovišti, nebo vzorky posílat k diagnostice do veterinárních, či humánních laboratoří. Každá z uvedených variant má své opodstatnění a správná rozhodnutí souvisejí s potřebami a populací pacientů jednotlivých veterinárních ordinací. [2]

Laboratoře pro humánní vzorky zpravidla nemají referenční rozmezí pro rozličné zvířecí druhy, ale přesto mohou být dobře nápomocné k diagnostice zvířecích nemocí. V takových laboratořích mohou být přesně stanoveny například hladiny elektrolytů, glukóza, urea, kreatinin a další analyty. Z veterinárně specifických stanovení, jež nelze stanovit v klasických laboratořích, lze jmenovat například hladiny různých proteinů, hemostázu, imunologické a hematologické vyšetření. V případě potřeby stanovení méně obvyklých veterinárních vyšetření je vhodné využívat služeb místních humánních laboratoří. [2]

V dnešní době je standardem, že humánní klinické laboratoře nabízí i možnosti stanovení veterinárních vzorků. Z tohoto důvodu zavádí nové metody, nakupují speciální přístroje, zaměstnávají veterinární lékaře, školí personál, proto jsou kvalitou stanovení i interpretací výsledků prakticky srovnatelné s veterinárními laboratořemi.

## **Rozsah stanovení**

Jednotlivé laboratoře se liší nabídkou testů. Standardem jsou základní i specializovaná vyšetření pro malá i velká zvířata v oborech klinické biochemie, imunologie, sérologie, hematologie, genetiky, mikrobiologie či parazitologie, případně i toxikologie. Mimo to, některá pracoviště vyšetřují i kvalitu vody a krmiv nebo stanovují radioaktivitu. Pro představu jsem do přílohy 1 zařadila kopii aktuální veterinární žádanky.

## **Zvolení konkrétních testů veterinárním lékařem**

Pro to, aby lékař zvolil vhodný test pro zvíře, který bude určovat specifickou diagnostickou odpověď, si musí položit konkrétní otázku, co přesně chce od laboratoře stanovit. [2] Vodítkem mu mohou být tzv. orgánové profily, či programy, ze kterých si může vybrat dle klinických nálezů. [3] Některé profily a stanovení lze vidět ve veterinární žádance (viz příloha 1).

Možnosti veterinární diagnostiky v laboratorní praxi jsou příliš obsáhlým tématem. Z uvedeného důvodu je třeba se v této bakalářské práci zaměřit na konkrétní oblast stanovení, proto se budeme dále věnovat oblasti možností laboratorního stanovení plodné fáze cyklu samic, a tak nejvhodnější doby pro krytí samcem. V následujících kapitolách budou detailně charakterizovány jednotlivé fáze pohlavního cyklu samic a jejich hormonální řízení. Také zde zmíníme základní znaky pro odhad ovulací chovatelů u některých druhů. Okrajově zde popíšeme dosud používané možnosti laboratorního stanovení říje fen, ale zaměříme se především na sledování hladin sérového progesteronu, což bude i náplní praktické části tohoto textu.

## 2.2 Estrální cyklus samic

Pojem estrální cyklus definuje periodické fyziologické změny, které je možno pozorovat na pohlavních orgánech a v chování samic domácích savců. V intervalech, charakteristických pro jednotlivé druhy, se pravidelně opakují časově omezené periody svolnosti k páření. [4] Slovo estrus je odvozeno z řeckého oistros – říje.

Čas od počátku říje po další svolnost k páření nazýváme jedním intervalem cyklu. Dle četnosti výskytu říje v roce rozdělujeme zvířecí druhy na monoestrické, diestrické a polyestrické. Mezi monoestrická zvířata, mající říji jedenkrát ročně, patří většina divokých šelem. [4] Ze všech plemen psů, je přibližně 26% fen monoestrických (nejčastěji primitivní nebo přírodní plemena), 70% diestrických, hárají dvakrát ročně a pouze 9% třikrát ročně (malá plemena). [5] Polyestrická zvířata, mezi něž se řadí většina samic domácích druhů, prodělají ročně více než dva estrální cykly. Sezónní polyestrické druhy cyklují v závislosti na délce světelného dne, jsou tzv. fotoperiodické. Patří mezi ně například klisna, kočka, koza nebo ovce. [4] *„Další diferenciace lze pozorovat v typu ovulace. U většiny zvířat dochází ke spontánní ovulaci, ale u koček, králíků, velbloudů je ovulace vyvolána stimulací smyslových receptorů v pochvě a děložním krčku při koitu.“* [10, str. 5]

Estrální cyklus je zpravidla rozdělen do čtyř stádií podle chování či probíhajících změn ve vaječnicích. [4] Tato stádia jsou označována jako proestrus, estrus, metestrus a diestrus a budou podrobněji definována v následujících podkapitolách. Periodu lze rozdělit i z pohledu folikulárního – proestrus a estrus, ve kterých převládají estrogény, a luteálního – metestrus a diestrus. [4] Období bez estrálních cyklů nazýváme anestrus.

**Fotoperiodická zvířata** zahajují sexuální aktivitu závisle na délce světelného dne a době březosti. Mláďata se rodí do takových podmínek prostředí, které jsou nejvýhodnější pro jejich přežití. Fotoperioda, střídání světla a tmy, je nejdůležitějším

faktorem ovlivňujícím sezonní páření. Anestrus tak začíná v pozdním podzimu se zkracujícím se dnem. Ovariální cyklus opět nastává na konci zimy nebo časně z jara, kdy se prodlužuje den. [4]

### **Proestrus**

Tato fáze, bezprostředně předcházející říjí, je specifická výrazným zvýšením aktivity reprodukčního systému. U polycyklických druhů ustupuje žluté tělísko z předchozího cyklu a nastává folikulární růst. Je patrné mírné zvětšení dělohy, děložní sliznice se prokrvuje a její žlázy zvyšují sekreční aktivitu. Vaginální sliznice se více prokrvuje, přibývají buněčné vrstvy epitelu a povrchové vrstvy rohovatí. Feny vykazují vnější znaky této fáze v podobě oteklé a prokrvené přezky s krvavým výtokem. [6]

### **Estrus**

V průběhu estru samice aktivně vyhledává samce a dává mu na vědomí, že je ochotná k páření. V podstatě je počátek a konec této "fáze přijetí" jediným přesně měřitelným místem estrálního cyklu, z pohledu chování samice, a proto jej využíváme pro stanovení referenčních rozmezí délky cyklu samic. [6]

Žlázy pohlavních orgánů, konkrétně děložní, cervikální a vaginální, sekretují více hlenu. Pozorujeme překrvení vaginálního epitelu a děložní sliznice, uvolnění děložního čípku. Folikulární růst je v nepřítomnosti aktivního žlutého tělíska v průběhu proestru a estru zajištěn hlavními ovariálními hormony – estrogény. [6]

U všech domácích zvířat dochází k ovulaci, s výjimkou krávy, které nastává až 12 hodin po ukončení estru. Ovulace se u nich spouští spontánně, jen kočka, králík a velbloud mají ovulaci vyvolanou koitem. [6]

## **Metestrus**

*„Granulární buňky od-ovulovaného folikulu podněcují luteální buňky, které jsou odpovědné za vznik žlutého tělíska. Snižuje se množství sekretu žláz dělohy, děložního čípku a pochvy.“ [6, str. 6]*

## **Diestrus**

V této fázi je žluté tělísko plně funkční a vylučuje hormon progesteron. Jeho působením nastává hyperplazie – zvýšení počtu buněk, a hypertrofie – zvětšení objemu buněk, dělohy. Děložní čípek je sevřený, nepatrné množství sekretů pohlavního ústrojí je lepkavé a vaginální sliznice postupně bledne. [6]

## **Anestrus**

Anestrus, fáze sexuálního klidu, je charakteristická minimálním folikulárním vývojem. V období pohlavního klidu pozorujeme žluté tělísko v původním zmenšeném a nefunkčním stavu. Děložní čípek je stále sevřený, tuhých sekretů se vylučuje nepatrné množství a vaginální sliznice je zcela bledá. [6]

## **2.3 Charakteristiky estrálního cyklu u vybraných druhů savců**

Průběh estrálního cyklu je u jednotlivých domestikovaných druhů savců obecně podobný, avšak každý druh má svá specifika, např. v délce cyklu a jednotlivých fázích cyklu (viz tabulka 1). Počátek puberty kolísá s věkem samice, u některých druhů s nástupem pářicí sezóny. [4] V následujících podkapitolách budou ve zkratce zmíněna některá specifika vybraných samic, nejpodrobněji se zaměříme na feny v kapitole 2.4.

Tabulka 1 Shrnutí základních specifíků estrálních cyklů vybraných samic.

Zvíře	Nástup puberty (měsíce)	Průměrný věk při zapuštění	Délka estrálního cyklu (dny)	Délka říje	Délka březosti (dny)
<b>klisna</b>	18 (10–24)	2–3 roky	21 (19–21)	5 dnů (4,5–7,5 dne)	336 (323–341)
<b>kráva</b>	4–24	14–22 měsíců	21 (18–24)	18 hod. (12–28 hod.)	282 (274–291)
<b>ovce</b>	4–12 (první podzim)	12–18 měsíců	16,5 (14–20)	24–48 hod.	150 (140–160)
<b>prasnice</b>	3–7	8–10 měsíců	21 (18–24)	2 dny (1–5 dnů)	114 (110–116)
<b>fena</b>	6–24	12–18 měsíců	6–12 měsíců	9 dnů (5–19 dnů)	63 (60–65)

Zvíře	Čas ovulace	Optimální čas pro zapuštění	Vhodný čas pro zapuštění po porodu
<b>klisna</b>	1–2 dny před koncem estru	3–4 dny před koncem estru nebo 2. či 3. den estru	okolo 25–35 dnů nebo v druhé říji; okolo 9. dne nebo při první říji pouze je-li vše normální
<b>kráva</b>	10–15 hod. po konci říje	těsně před středem říje až po konec říje	90–60 dnů
<b>ovce</b>	12–24 hod. před koncem říje	18–24 hod. po nástupu říje	obvykle následující podzim
<b>prasnice</b>	30–36 hod. po nástupu říje	12–30 hod. po nástupu říje	V první říji 3–9 dnů po odstavu selat
<b>fena</b>	1–2 dny po nástupu pravé říje	2–3 dny po nástupu říje; nebo 10–14 dnů po nástupu proestrálního krvácení	obvykle v první říji nebo 2–3 měsíce po odstavu štěňat

Zdroj: [4, str. 406]



### 2.3.1 Klisna

Nástup **puberty** a **pohlavní dospělosti**, u klisny přichází v následující pářící sezóně po jejím narození. Pokud je období mezi narozením a začátkem sezóny krátké, například narodí-li se v létě, puberta se oddálí o 12 měsíců. Proto je interval počátku pohlavní dospělosti poměrně široce stanoven na 12–18 měsíců. [4] **Chovatelská dospělost**, tedy vhodná doba k zařazení klisny do chovu, přichází ve věku 3,5–4 let. **Tělesná dospělost** nastává s dokončením růstu trvalého chrupu, tedy ve stáří 5–6 let. [7]

Příznaky **říje** u klisen, tzv. **hřínání**, se projevují překrvením, zduřením a zčervenáním stydkých pysků a pochvy, která je vlhká s řídkým a čirým hlenovým sekretem. Klisna rytmicky rozevívá a uvolňuje stydké pysky, topoří klitoris neboli „blýská“. [7] Samice zdvihá ocas, doširoka rozkročuje končetiny, často močí. [4] *„Klisna v říji vyhledává druhé koně, tlačí se na ně, často řehtá, na pastvě skáče na druhé klisny, při dotyku ošetřovatele se hrbí. Špatně žere, při práci je nespolehlivá.“* [7, str. 203-204]

**Ovulace** nastává 24 hodin před koncem říje. V případě nezabřeznutí dochází k říji opakovaně po 17–28 dnech, v průměru po 21 dnech. **Délka říje** může mít rozpětí od 3 až do 10 dnů. [7]

Nejvhodnější **dobu k přípuštění** lze odhadnout tzv. „zkoušením klisen“. Samice se postaví ke dřevěné, přibližně 1,5m vysoké, zkušební stěně, která chrání koně i chovatele. Za stěnou stojí zkušený hřebec „prubíř“. Klisna klidně stojí, blýská, případně močí, pokud je svolná k přípuštění. V opačném případě samce odmítá, kope, piští a utíká. [7] *„Jsou-li jednotlivé klisny zkoušeny u více hřebců, mohou reagovat rozdílným způsobem. Normálně cyklující klisna by měla být denně zkoušena u stejného hřebce.“* [8, str. 110] Odmítání hřebce je spojeno s rostoucí hladinou sérového progesteronu, jehož hodnoty se ustalují v průběhu až 5 dnů, což je důvodem pro možné projevy zevních příznaků říje prvních 48 hodin po ovulaci. [8]

### 2.3.2 Dojnice

**Puberta** jalovic kulturních plemen nastává ve věku 7–12 měsíců, primitivních plemen později. [7] **Chovatelská dospělost**, tedy věk, kdy lze samice poprvé připustit bez negativních dopadů na dokončení jejich vývinu a vzrůstu, se u dojených plemen pohybuje ve věkovém rozmezí 14–16 měsíců, u masných plemen od 18 od 20 měsíců věku. **Tělesná dospělost**, dokončení růstu a vývoje orgánů, přichází ve 4–6 letech věku. [9]

Příznakem **říje** je oteklá a zarudlá pochva a vulva, ze které vytéká hustý, průzračně sklovitý hlen na počátku říje, na konci zahnědlý až krvavý, kráva tzv. „provázkuje“. Charakteristickým projevem pravé říje samice je reflex nehybnosti a postoj k páření, pokud na ni naskakuje jiná plemenice a ona sama naskakuje na druhé. Mimo to často bučí, je neklidná, zvyšuje se její tělesná teplota a snižuje dojivost. [7, 10]

Na rozdíl od většiny domácích druhů, ovulujících na konci estru, krávy **ovulují** přibližně 12–14 hodin po estru. [4] **Délka estrálního cyklu** se pohybuje v rozmezí 18–24 dní s průměrem 21 dní. Reprodukční cyklus, interval mezi porody, trvá 12–13,5 měsíce. [10]

*„Vyhledávání říje ve stádě krav je základním předpokladem úspěšné prosperity daného chovu.“* [9, str. 23] Důležitý je v tomto procesu zkušený pracovník, který zodpovídá za **detekci říje** ve stájích a vedení podrobné dokumentace. Tento zootechnik pak úzce spolupracuje s veterinárním lékařem, ošetřovateli a inseminačním technikem. [9]

Čas vhodný pro inseminaci stanovujeme s ohledem na tyto čtyři faktory: čas ovulace; čas životaschopnosti a správné funkčnosti vajíčka (5–6 hodin); potřebný čas pro kapacitaci spermií, tedy změnu povrchu spermií umožňující průchod samičími

pohlavními orgány do vejcovodu a následné uchycení (5–6 hodin); doba životaschopnosti spermií (20–24 hodin). [10]

Prostředky pro detekci říje krav lze rozdělit na automatizované a neautomatizované. Automatizované zahrnují metody založené na změnách elektrického odporu tkání pohlavního ústrojí, sledování zvýšení intravaginální teploty a teploty mléka. Lze využít i tlakové senzory pro určení reflexu nehybnosti, pedometry a aktivity-metry, jež sledují zvýšenou aktivitu a pohyb plemenic v říji (která je 2–4x vyšší oproti kravám v diestru). Mezi neautomatizované prostředky řadíme detektory vzeskoku umístěné na pánvi krávy (stíratelné barvy), prubíře, videozáznam stáda nebo progesteronový test mléka. [10] *„Prostředky pro detekci říje a doby inseminace jsou obvykle účinnější, ale nemusí být přesnější než vizuální pozorování. [10, str. 25]* Metodou stojící mimo předchozí rozdělení je hodnocení krystalizace (arborizace) cervikálního hlenu, který se provádí mikroskopickým pozorováním hlenu na podložním sklíčku. Tímto stanovením lze vysledovat počátek říje i optimální dobu pro inseminaci a připouštění, podle změny tvarů krystalizovaného hlenu, nejen u krav, ale i u většiny chovaných hospodářských druhů savců. [10]

### 2.3.3 Prasnice

Prasničky **pohlavně dospívají** v 6–7 měsíci po narození, nezávisle na ročním období jejich narození. V tomto období mohou být i připuštěny, ale pro větší efektivitu chovu se zpravidla čeká na třetí estrus po nastoupení puberty, kdy je počet ovulovaných vajíček vyšší než u předchozích dvou estrů. **Chovatelská dospělost** se proto nejčastěji stanovuje na období 8–10 měsíců. [4] Ideální hmotnost mladé prasnice pro první oplodnění je 120–140 kg, kdy jsou již dobře vyvinuty pohlavní orgány i mléčné žlázy. Projevy sexuálního chování lze pozorovat nejdříve ve stáří okolo 5 měsíců s tělesnou váhou 50–60 kg. [11]

*„Příznaky říje – estru jsou: otok vulvy, neklid, snížená chuť k žrádлу. Zatlačíme-li prasnici na hřbet v křížové oblasti během říje, dostaví se reflex znehybnění, podobně jako při zapouštění kancem.“ [4, str. 408]*

Prasničky jsou v průběhu celého roku pravidelně polyestrické s průměrnou **délkou estrálního cyklu** 21 dní, v rozmezí od 15 do 25 dní. Luteální fáze probíhá do 15–17 dní cyklu, folikulární pak přibližně následujících 6 dní. [11] **Ovulace** nastává

30–36 hodin po nástupu estru a trvá průměrně 2 dny, s maximálním rozpětím 1–5 dnů. [4] *„K ovulaci dochází na obou vaječnicích a uvolňuje se 14 až 16 vajíček.“ [4, str. 408]*

Vhodnou dobu pro připuštění nebo inseminaci prasnice lze odhadovat sledováním změn na zevních pohlavních orgánech a říjového chování, které se může v průběhu roku měnit. Chovatel proto celoročně sleduje u každé samice délku cyklu a vlastní říje. K **detekci říje** může napomocť i progesteronový test stanovovaný z krve prasnic, který je třeba opakovaně provádět v intervalu 8–10 dnů. [11] V luteální fázi je hladina progesteronu v plazmě v rozmezí 20,0–50,0 ng/ml, s nástupem říje se hormon snižuje na hodnotu 4,0 ng/ml nebo nižší. [2]

#### 2.3.4 Ovce

Některá plemena ovcí jsou polyestrická po celý rok, například ovce karakulská nebo awassi, avšak u většiny plemen probíhá estrální cyklus a říje sezónně, na severní polokouli většinou na podzim a v zimě. [7] Narodí-li se tedy mládě mezi prosincem a březnem, **puberta** u něho přichází další první podzim, tudíž v rozmezí 4–12 měsíců věku. [4] *„Pohlavní dospělost záleží na úrovni výživy, zdraví, ošetřování, ustájení, podnebí, plemenné příslušnosti, pohlaví a na jiných podmínkách. Plemena ovcí se dělí na časně a pozdně dospívající.“ [7, str. 240]* Mladé ovce se **poprvé připouštějí** ve věku 12 měsíců, pozdní plemena po dosažení 18–30 měsíců života. [7]

Přítomný estrus ovcí nemá specifické viditelné projevy na pohlavních orgánech, proto se často nazývá jako tzv. **tichá říje**. [7] Pokud pozorujeme chování říjící se ovce, můžeme si všimnout třepání ocasu a její nápadné přibližování se k beranům nebo k jejich ohradě, pokud ohrady sousedí. [4]

Průměrná **délka estrálního cyklu** ovce je 16 a půl dne s kolísáním od 14 do 20 dní. Vhodný čas pro zapuštění ovce se doporučuje od 18 do 24 hodin po nástupu říje. Čas **ovulace** nastává 12–24 hodin před koncem estru. [4] Množství uvolněných vajíček se liší mezi jednotlivými plemeny a záleží i na výživě, věku a zdravotního stavu ovce. Nejčastěji dozrají 1–3 folikuly. Sama fáze estru trvá průměrně 36 hodin, s širokým rozmezím 3–84 hodin. Pokud bahnice (pozn. slovo bahnice souvisí se specifickým názvem porodu ovce, tzv. bahnění) nezabřezne, její cyklus se opakuje od podzimních až do zimních měsíců. [7]

Protože **rozpoznání** tiše říjící ovce není snadné, využívá se k tomu zkušený beran, tzv. prubíř. Beran má zakrytý pohlavní orgán zástěrkou, připevněnou přes hřbet, takže ovci neoplodní a ovce může být připuštěna vhodným chovným beranem nebo inseminována. V chovu ovcí se využívá i volné připouštění – ve stádu ovcí je několik beranů, kteří volně oplodňují samice podle jejich říje. [7]

### 2.3.5 Koza

Estrální cyklus koz v tropech probíhá celoročně, jen mírně kolísá v jednotlivých ročních obdobích. Na celoročně pohlavně aktivní a sezónní lze rozdělovat africká plemena. V mírném páse jsou plemena ovlivněna probíhající sezónou. [7]

**Puberta** koz v mírném pásmu nastává ve věku 8–9 měsíců, ale k páření často dochází až v další pářící sezóně. [4]

**Projevy** přítomné říje koz jsou velmi podobné projevům estru ovcí. Kozy tedy třepají ocasem a přibližují se ke kozlům. [4] Pro zajímavost bych zde uvedla,

že sexuální aktivita kozlů je vysoká a neplodní kozli s normálně vyvinutými pohlavními žlázami jsou velmi vzácným jevem. [7]

K **ovulaci** dochází 12–24 hodin před koncem říje. [4] **Délka estrálního cyklu** se pohybuje v rozmezí 18–21 dní. Fáze estru probíhá 24–36 hodin. [7]

### 2.3.6 Kočka

Kočka je zvíře sezónně polyestrické. Na severní polokouli nastává pářící sezóna v období mezi lednem a říjnem. [4] Kočky žijící v bytě mají často sezónnost zastřenou, a tak jejich estrální cyklus může probíhat téměř nepřetržitě. Nejspíše je tento jev způsoben umělým světelným režimem. [12]

**Puberta** koček nastává ve věku 4–18 měsíců. Tak velkou variabilitu nástupu cyklu určuje nejen roční doba, ve které se kočka narodila a sezónní říje, ale i její tělesný vzrůst, plemenná příslušnost a další individuální faktory. Kočky zpravidla dosahují estru po dosažení minimální hmotnosti 2,5 kg. U dlouhosrstých plemen nastává puberta později než u krátkosrstých. [12] Dověření **chovatelské dospělosti** kotěte se doporučuje stanovit nejdříve na 1 rok stáří. Kočka je **tělesně dospělá** ve věku třech let. [13]

**Říjící** kočka je výrazně mazlivější než obvykle. Plazí se hrudníkem po podlaze, hlasitě mňouká, tře se o většinu objektů – kusy nábytku, zdi, lidi, aj. [4] Prohýbá se v kříži, nastavuje zadeček, přešlapuje. Samičky v estru nekrvácí jako feny, avšak některé mohou vylučovat malé množství čírého hlenu a častěji močit. [13]

**Ovulace** koček je indukovaná, vyvolá ji do 24–48 hodin kopulace či vaginální stimulace. Lze vyvolat i uměle podáním hormonů. [12]

## 2.4 Charakteristika estrálního cyklu feny

Jak je již uvedeno v kapitole 2.2, většina fen je diestrických, původní a divoká plemena jsou monoestrická, existují však i feny, které hárají 3–4x ročně. [15] **Puberta** nastupuje 2–3 měsíce po vzrůstu samice do velikosti a hmotnosti dospělého zvířete. [4] Průměrně je to ve stáří 6–7 měsíců s fyziologickým rozmezím 4–22 měsíců. Nástup sexuální dospělosti závisí na rychlosti fyzického vývoje a způsobu chovu, výživě, zdravotním stavu, stresu a plemenné příslušnosti – malá plemena mohou hárat již mezi 6–10 měsíci, velká až okolo 20 měsíců věku. První říje bývá atypická. Očekávaný průběh přichází nejdříve s druhým háráním, proto se **chovatelská dospělost** fenky udává nejdříve s druhým až třetím estrem. **Tělesná dospělost**, především velkých plemen, ale přichází později se zcela ukončeným růstem. [5] Obecně platí, že by se fenky neměly nechávat připouštět dříve, než v 1 roku stáří, u jednotlivých plemen věk konkretizují chovatelské svazy. [14]

V této kapitole jsou charakterizovány jednotlivé fáze cyklu fen, změny přicházející s vyšším věkem fen a hormonální řízení jejich estrálního cyklu.

### 2.4.1 Fáze estrálního cyklu

**Pohlavní cyklus** fen je rozdělen do 4 etap – proestrus, estrus, metestrus a anestrus. Některé zdroje věnující se psí reprodukci zaměňují metestrus za diestrus. Diestrus je obecně fází žlutého tělíska, to se ale u fen, na rozdíl od ostatních druhů, tvoří již v průběhu estru, což objasňuje pojem metestrus u fen. [14]

#### **Proestrus**

Proestrus, někdy nazýván **tzv. barvení**, je fáze charakteristická krvavým vaginálním výtokem, který je u fen individuálně intenzivní a pozorovatelný. [14] První den barvení se obvykle počítá jako první den prostru. Přezka otéká, fena často

močí, může být neklidná a neposlušná. [16] Pomalu se začíná uvolňovat děložní krček. Pro psy je již fenka velmi atraktivní, ale stále je odmítá. Jako jeden z důvodů tohoto jevu se uvádí strategie feny, která si svojí atraktivitou v přírodě zajistí větší počet samců, ze kterých si může v estru vybírat. [15] Může se vyskytnout i anomálie, kdy fena samce přijme. [16] Fáze trvá v průměru 9 dní s fyziologickým kolísáním 3–17 dnů. [12]

Ve vaječnicích působením zvyšujících se koncentrací **hormonu** estradiolu dochází k růstu folikulů. Pod vlivem estrogenů vaginální sliznice zesílí ze dvou vrstev přibližně na dvacet. [12]

## **Estrus**

Vaginální výtok se z krvavé barvy mění na růžový, hnědý, slámový až sklovitě průhledný a jeho intenzita ustává. [16] Vyskytují se i feny, u kterých může krvavý výtok přetrvávat. Přezka je menší a měkčí než v proestru. [14] Poševní sliznice bledne, osychá, je zřasená a lepivá, proto aby fena napomohla svázání při krytí. Fena je svolná ke krytí, vyhledává psy a nabízí se jim, pevně stojí a ocas dává na stranu. [15] Estrus trvá průměrně 9 dní, s rozmezím 3–21 dní. **Ovulace** nastává v 2–4 den říje a trvá nejvýše 24 hodin. [14] Jiný zdroj uvádí, že ovulace může nastat v rozmezí 2 dny před počátkem estru až do 7. dne estru a trvá 12–72 hodin. [16] Z toho plyne, že tato fáze je velmi individuální v rámci jedince, plemene i chovu.

*„Při ovulaci se uvolňují oocyty I. řádu, ve kterých se dokončuje ve vejcovodu v průběhu 1–3 dnů první část meiotického dělení a dozrávají tak na oocyty II. řádu. Tím dosahují schopnosti oplození, která přetrvává 12–48 hodin.“* [18, část: Hormonální řízení pohlavního cyklu]

Na počátku estru klesne hladina **hormonu** estradiolu a s nastupující ovulací lze v séru pozorovat náhlou vlnu progesteronu. [14] Progesteron produkují žlutá tělíska, utvořená po prasknutí Grafových folikulů, kterých může v jednom cyklu



dozrát

4–6 a v každém z nich mohou být až 3 vajíčka. Proto počet folikulů neurčuje reálný počet narozených štěňat. [16]

### **Metestrus**

Toto stádium nastává u nebřezích fen. Pokud by vajíčka feny byla oplodněna, místo metestru by po estru nastala březost, porod a laktace. Fenka psa již odmítá. [16] Pro méně zkušené jedince může být stále přitažlivá. Celkově se zklidňuje, poševní sliznice se navrácí k normálnímu stavu a vaginální výtok pomalu ustává. [15] Tato fáze trvá přibližně 9–12 týdnů. [14]

Hladina progesteronu v průběhu metestru vrcholí, dále postupně klesá a na konci fáze se vrací k bazálním hodnotám. Březí feny v této době již rodí. [12] Hladiny **hormonů** mají ve fázi estru a metestru u březích i nebřezích fen zcela stejné hodnoty, proto často dochází k tzv. falešné březosti. [16]

### **Anestrus**

Tato fáze začne po ukončení činnosti žlutých tělísek, tzn. s poklesem hladiny progesteronu. [12] Je to období klidu bez jakýchkoli příznaků typických pro estrální cyklus. Prostřednictvím vyšetření bylo zjištěno, že se mohou vytvářet 3–4 folikuly, které nedozrají, ale atrofují. To může způsobit mírné zvýšení koncentrace estrogenů v krvi. [14] V anestru probíhá regenerace sliznice dělohy a dokončuje se 120–150 dní po začátku estru. Feny, které nerodily ukončí regeneraci přibližně o 20 dní dříve. Délka anestru je individuální a určuje počet estrálních cyklů feny. Obvyklé rozmezí je 120–150 dní s kolísáním od 65 dnů do 300 dnů. [16]

Dodnes není známé, co přesně ovlivňuje přechod z anestru do proestru. Spekuluje se o GnRH a LH (gonadoliberin a luteinizační hormon; hormony ovlivňující cykly samic, detailněji popsány v kapitole 2.4.2 hormonální řízení).

Období sexuálního klidu je možno zkrátit podáním agonistů dopaminu – bromokriptinu aj., které potlačí sekreci prolaktinu. Není jisté, zda má snížení prolaktinu vliv na folikulární růst nebo spočívá ovlivnění délky anestru v účinku agonisty. [12]

### **Stárnoucí feny**

Feny o estrální cyklus v průběhu života nepřichází, ale mezi 5. a 7. rokem stáří začne být cyklus nepravidelný, anestrus se prodlužuje a samice se může stát až monoestrickou. Typické projevy říjového cyklu jsou nevýrazné. Mimo to se s věkem zvyšuje pravděpodobnost patologií. Po 9. roce života se s více než 60 % pravděpodobností tvoří některé z patologických změn, např. cysty, hyperplazie, atrofie nebo nádory dělohy. [14] „Po 7. roku života se zvyšuje počet nepravidelných pohlavních cyklů, odúmrtí plodu v březosti, spontánních potratů, počet ztížených porodů, frekvence výskytu anomálií u novorozených štěňat, snižuje se velikost vrhů a pravděpodobnost zabřeznutí.“ [16, str. 10]

#### **2.4.2 Hormonální řízení**

Pro popis ovlivnění jednotlivých hormonů hormony jinými se využívá pojmu endokrinní osa, která se pojmenovává dle periferní žlázy nebo hlavního účinku. Literatura se zmiňuje o ose tyroidální, adrenokortikální, růstové, laktační a gonadální, jejímž částem se v této podkapitole budeme dále věnovat. [12] „*Gonadální osa: hypothalamus: GnRH → adenohipofýza: FSH, LH → gonády: testosteron, estrogeny, progesteron.*“ [12, str. 19] (pozn. FSH je zkratka označující folikulostimulační hormone, detailněji je popsán níže v této kapitole). Tuto spojnici hypothalamu, hypofýzy a gonád ovlivňují vnější podněty z okolí samice, které přijímá CNS (zkratka pro centrální nervovou soustavu). [10] V přílohách (viz příloha 2) přikládám schématický diagram hladin jednotlivých hormonů, které se liší v jednotlivých fázích estrálního cyklu fen.

## GnRH

V literatuře nejčastěji používaná zkratka hormonu GnRH (z anglického Gonadotropin-releasing hormone) je do češtiny překládá jako gonadoliberin. [17] Lze jej dohledat i pod označením LHRH – luteinizing hormone-releasing hormone; doslova přeloženo – hormon uvolňující luteinizační hormon. [4]

Tvoří jej endokrinní neurony po stimulaci z CNS, a tak jako LH a FSH je uvolňován v pulsech. [10] Sekretuje se při snížení hladiny LH, čímž ovlivní zvýšení hladiny LH. Obdobným způsobem reguluje i sekreci FSH. [4] *„Obecně platí, že zvyšující se koncentrace estrogenů zapříčiňuje zvýšení citlivosti předního laloku hypofýzy vůči LHRH. To má za následek zvyšující se uvolňování gonadotropinů. Progesteron snižuje citlivost předního laloku hypofýzy vůči LHRH a koncentrace FSH a LH klesají.“* [4, str. 400] Tvorbu tohoto peptidu v těle samice tedy ovlivňují nervové, hormonální a metabolické podněty. [11]

## LH a FSH

Spojení písmen LH označuje luteinizační hormon neboli lutropin, FSH pak folikulostimulační hormon – folitropin. [17] Oba se nazývají gonadotropiny, protože ovlivňují buňky vaječnicků samice, působí uvnitř gonád. [4]

Tyto glykoproteiny jsou produkovány buňkami předního laloku hypofýzy. [4] Zvýšená sekrece gonadotropinů nastává na konci anestru, po období jejich bazálních koncentrací, kdy se nejdříve začne uvolňovat FSH. S počátkem estru hladina LH dosáhne maximálních hodnot, které přetrvávají 24–36 hodin. Tento peak je nazýván tzv. LH vlnou, po které dochází (v rozmezí 24–96 hodin) k ovulaci. [18] FSH podněcuje růst ovariálních folikulů. [10] *„LH je důležitý pro ovulaci a luteinizaci granulózy, což je základní aspekt tvorby žlutého tělíska.“* [4, str. 399, 400] Společně ovlivňují sekreci estrogenů, progesteronu a GnRH a zároveň je jejich hladina i těmito hormony ovlivňována, jak již bylo popsáno výše.

## Estrogeny

Estrogeny jsou tvořeny skupinou steroidních hormonů. Nejdůležitější zástupci této skupiny pro pohlavní systém ženy jsou  $17\beta$ -estradiol (estradiol) a estron. [4]

Estradiol se tvoří ve folikulech tímto způsobem: působením FSH vývoj folikulů → LH aktivuje syntézu androstenedionu z molekul cholesterolu → přeměna na testosteron → působením FSH aromatizace testosteronu na  $17\beta$ -estradiol (v granulózních buňkách). [10] Přibližně 4 týdny před nástupem proestru se začíná zvyšovat do té doby bazální hladina estradiolu. [14] **Koncentrace** měřená v periferní krvi v anestrálním období (nižší než 15 pg/ml) se na počátku proestru postupně zvýší až na 60 pg/ml. V závěru proestru dosahuje estradiol hladiny 120 pg/ml, tedy jeho maximální koncentrace. Zároveň se s luteinizací folikulů postupně zvyšuje produkce progesteronu na úkor estrogenů. [18] Proto na počátku estru pozorujeme náhlé snížení koncentrace estradiolu se současným náhlým zvýšením hladiny progesteronu. [14] Poznámka k jednotkám: V současné době se v evropských zemích preferuje užívání jednotek SI (v případě estradiolu pmol/l), proto je hodnota udaná v pg/ml spíše zastaralou formou, která ovšem i v soudobé literatuře není neobvyklá.

Funkce estrogenů je velmi rozmanitá. Způsobují vyvolání projevů říje a růst buněk děložní sliznice, vaskularizaci v ovariích, nárůst epitelu vejcovodů a další fyziologické procesy. [12] *„Estradiol má pozitivní zpětnou vazbu na hypotalamus a hypofýzu. Zvyšuje frekvenci pulzů GnRH. Nad určitou mezní hodnotu estradiolu reaguje hypotalamus uvolňováním GnRH. Toto uvolňování GnRH vyvolává uvolňování LH, který iniciuje ovulaci.“* [10, str. 6]

## Progesteron

Obdobně jako estradiol je i progesteron steroidní hormon, který je tvořen z cholesterolu přes pregnenolon (viz příloha 3). Progesteron je hlavním přirozeným zástupcem skupiny gestagenů (progestinů). [12] Sekretuje jej corpus luteum, ovaria,

placenta a kůra nadledvin. [4] V krvi se vyskytuje navázaný na bílkovinu albumin, v játrech je konjugován kyselinou glukuronovou a z organismu je progesteron vylučován především močí. [12]

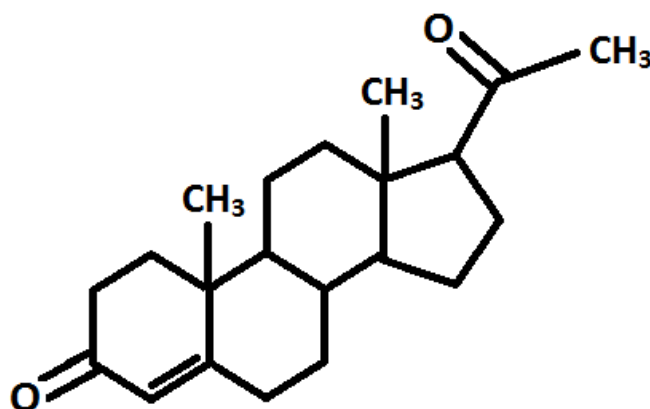
Jak již bylo popsáno v předešlých odstavcích a je i patrné z obrázku v příloze 2, vlna progesteronu střídá předešlou vlnu estrogenů. Uvádí se, že je třeba estrogenové primární působení zcitlivující a nabuzující tkáně pro přijetí signálu poskytovaného progesteronem. [4] Na počátku anestru, kdy žlutá tělíska ukončila svoji činnost, klesla koncentrace progesteronu v periferní krvi pod hodnotu 0,6 nmol/l. [12] Podobně jako u estrogenů bývají v literatuře využívány jednotky ng/ml. Bazální anestrální koncentrace pak odpovídá hodnotě 1 ng/ml a méně. [18] Hodnoty lze přepočítávat následujícím vztahem: ng/ml se rovná hodnotě v nmol/l vydělené číslem 3,18. [19] Na konci proestru se hladina progesteronu zvyšuje na hodnoty 2–4 ng/ml. **V čase ovulace** dochází k prudkému nárůstu koncentrace na **5 ng/ml** a více. Po ovulaci dochází k dalšímu zvyšování hladiny hormonu, která na konci estru bývá v rozmezí 15–25 ng/ml. Ve fázi metestru dosahuje progesteron svého maxima (přibližně 20.–30. den po ovulaci), ale poté již dochází k postupnému poklesu jeho koncentrací, kdy s hodnotou nižší než 1 ng/ml opět nastupuje období pohlavního klidu. [18] *„U nebřezích zvířat luteální fáze trvá přibližně 70 dní a u březích přibližně 63 dní od ovulace, přičemž během celé fáze jsou průměrné koncentrace u obou skupin zvířat obdobné. K náhlému poklesu progesteronu pod 1 ng/ml dochází u březích zvířat 24–36 hodin před porodem.“* [18, část hormonální řízení pohlavního cyklu] Pro celkové zpřehlednění zde uvádím tabulku 2, ve které jsou v jednotlivých dnech a fázích cyklu uvedeny hladiny progesteronu v jednotkách ng/ml i nmol/l.

Tabulka 2 Změny koncentrací progesteronu v průběhu estrálního cyklu feny

Fáze cyklu	Událost	C progesteron (ng/ml)	C progesteron (nmol/l)
Anestrus		<1	<3,2
Proestrus		<1	<3,2
	Den před LH peakem	1,0–1,9	3,2–6,0
P/E	Den LH peaku	2	6,3
Estrus	Den po LH peaku	3	9,5
	Doba ovulace	4–8	12,7–25,4
	1–5 dní po ovulaci	>8	>25,4
Metestrus (gravidita)		10–60	31,8–158,8

Zdroj dat: HUML, Oto. Možnosti endokrinologické diagnostiky v České republice. Veterinární klinika, 2012, roč. 9, č. 1, s. 47. ISSN: 1214-6080.; [18]

Hlavní funkcí progesteronu je udržení březosti samice. [16] Má v jejím organismu imunosupresivní účinky. [12] Dále pak zabraňuje nekontrolovatelným kontrakcím děložní stěny a napomáhá snadnějšímu uhníždění embrya. Progesteron zpětně snižuje uvolňování GnRH, a tak nedochází k další ovulaci. [10] Z jeho dalších funkcí bych zde uvedla podporu růstu alveolů mléčné žlázy, žláz endometria, stimulaci sekreční aktivity vejcovodu a endometria. [4]



Obrázek 1 Struktura steroidního hormonu progesteronu, vlastní zdroj

## 2.5 Možnosti určení vhodné doby pro krytí feny

Při pohledu na předešlý text, popisující projevy estrálního cyklu fen (popřípadě ostatních zmíněných samic) a jeho hormonální řízení, čtenář snadno nabyde dojmu, že určení optimální doby krytí fenky je zcela intuitivní a samozřejmá záležitost. Avšak opak je pravdou, chovatelská praxe bývá často odlišná. Některé feny, častěji malých plemen, mají nevýraznou či nepravidelnou fázi proestrálního krvavého výtoku. [15] Dokonce existují i samičky, které vůbec nekrvácí nebo se tak precizně čistí, že u nich není možné tuto fázi rozeznat. [20] Krytí feny nejspíše skončí zabřeznutím právě tehdy, pokud proběhne v čase ovulace. [14] Také nepravidelný nástup ovulace může být jedním z důvodů neúspěšné reprodukce. V praxi je přibližně u 50 % případů důvodem reprodukčního selhání nevhodné načasování krytí. [15] Proto se v této kapitole budeme věnovat metodám, které mohou správnému určení doby krytí napomoci a významně tak zvýšit pravděpodobnost očekávaného zabřeznutí feny a zefektivnit odchov.

### Posouzení vnějších fyzických změn a estrálních projevů

Z předchozích popisů změn chování v průběhu estrálního cyklu lze obecně vyvodit optimální plodnost feny na 3–5 den po jejím projevu zájmu o psy, případně na 2–3 den po jejím prvním svolení k vzeskoku psa. Tato metoda je u zkušených fen velmi efektivní. Problém však nastává u některých prvně krytých a ustrašených samic, které psa vůbec nepřijímají nebo naopak fenek, které jsou svolné nepřetržitě i víc než deset dní. [16] Komplikace této metody mohou nastat i na straně samce. Méně zkušené psy nezaujme fena ani na vrcholu estru a v druhém extrému jsou schopni nakrýt i přítomného samce. Opravdu zkušený pes fenu očichá a ví, zřídka kdy se splete. [15]

Pokud bychom chtěli období svolnosti odvodit z charakteristických výtoků z pohlavních cest, pak by nastal nejvhodnější čas mezi 10–14 dnem po prvním proestrálním krvácení nebo 2–3 dny po změně barvy krvavého výtoku

na světlejší. [16] Jako ideální se udává slabě růžový až zcela světlý. Problém nastává u žen, jež nemají zřetelný výtok nebo naopak u takových, které krvácí i v plodném období. [19]

### **Hodnocení změn vaginální sliznice v průběhu cyklu**

Je jistou zajímavostí, že je pochva zařazena mezi vnější pohlavní orgány ženy. Její sliznice v reakci na hormonální změny, probíhající v těle ženy, mění svůj vzhled. [15] V závislosti na těchto změnách hladin steroidních hormonů lze pozorovat i morfologické proměny slizničních buněk. [21]

Jednou z využívaných metod je **vaginoskopie**. Toto stanovení je snadné a rychlé. [14] Provádí se očním pozorování změn slizničních řas pochvy v průběhu cyklu pomocí endoskopu či spekula. Diagnostická hodnota ovšem pro určení vhodné doby krytí není příliš velká, proto je častěji využívána jako kontrola místa odběru vzorku pro cytologické vyšetření. [16]

**Vaginální cytologie** spočívá ve sledování buněk poševní sliznice, jejichž zastoupení, množství, zbarvení a tvar se mění působením různých pohlavních hormonů. [16] Estrogeny aktivují jejich mitotickou aktivitu, a tak plynule narůstá počet buněčných vrstev sliznice. Důvodem tohoto fyziologického jevu je mechanická ochrana sliznice při koitu. Po ovulaci postupně buňky ubývají až ke třem základním vrstvám. [21]

Provedení testu není složité a nijak nezatěžuje organismus ženy. Otisk buněk sliznice, provedený pomocí vatového tampónu, se převede na mikroskopické sklíčko, obarví a vyhodnocuje. [16] Hodnotí se zbarvení, tvar a poměr buněk (buňky bazální, parabazální, intermediální a superficiální), výskyt jejich jader, erytrocytů, leukocytů, histiocytů, endocervikálních a endometriálních buněk, mikroflóry a hlenu. [16, 21] Pokud je v otisku nalezeno více než 80 % superficiálních buněk zrohovatělých, je stanoven optimální čas pro krytí. Zrohovatění poševního epitelu



u 75 % fen nastává v den ovulace, ale existují i extrémní případy, kdy k tomu dochází i 10 dní před ovulací nebo jeden den po ovulaci. Proto se nedoporučuje využívat tuto metodu jako jedinou cestu k určení vhodného dne krytí. [14] Další komplikací tohoto stanovení je do jisté míry subjektivní hodnocení nálezu, a tak problematická interpretace a také nutnost opakovaných vyšetření. Vaginální cytologie tak podává přesnější informace o estrogenizaci fenky než o její nastávající ovulaci. [18]

### **Stanovení hladiny sérového progesteronu**

Stanovení koncentrace sérového progesteronu má v reprodukci fen největší praktické využití, ze všech pohlavních hormonů. Na základě znalosti aktuální hladiny tohoto hormonu lze poměrně přesně stanovit fázi cyklu, ve které se fena nachází i s několikadenním předstihem. **To ocení především majitelé opakovaně nezabřezávajících a komplikovaně se kryjících fen a také ti, kteří potřebují znát konkrétní den krytí, kvůli svým časovým možnostem nebo s kryjícím psem v delší vzdálenosti či v zahraničí.** Toto stanovení je také nezbytné, pokud chce majitel k inseminaci použít zamražené spermie, které jsou schopny oplodnit vajíčka jen pokud jsou již přítomny maturované ve vejcovodech, kvůli nízké době přežitelnosti přemražených spermií. [19] Z výše zmíněných metod se v dnešní době právě tato považuje za nejpřesnější a nejspolehlivější možnost pro potvrzení a stanovení ovulace a vhodného dne krytí. Navíc při dobrém přístrojovém vybavení laboratoře není stanovení hladiny sérového progesteronu obtížné ani cenově nedostupné. [16]

Tato metoda je založena na principu fyziologického zvýšení hladiny sérového progesteronu na počátku estru fenky. Test využívá konstantní dynamiku růstu koncentrace hormonu. Je tak stanoveno několik úrovní hladin, které jasně definují děje odehrávající se v pohlavním ústrojí fenky. [16]

## **Kombinace metod**

*„Na základě výše uvedených dat lze doporučit následný postup při časování krytí. První vyšetření (klinické vyšetření, vaginální cytologie, sonografie, vaginoskopie) je vhodné provést 2.–3. den po začátku příznaků hárání a podle nálezu (pokročilosti hárání) určit další termín k vyšetření (obvykle za 2–5 dnů). Tento postup opakovat do nálezu prokazujícího začátek říje. V tomto termínu je vhodné připojit vyšetření koncentrace progesteronu v periferní krvi, která již dále přesněji ukáže průběh říje. Při koncentracích nižších než 5 ng/ml opakovat vyšetření ve 2–5denních intervalech.“ [18, část termínování krytí]*

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce je krátce nastínit možnosti veterinární diagnostiky prováděné v klinických laboratořích. Z důvodu obsáhlosti tak širokého tématu se práce dále zaměřuje na reprodukci samic vybraných savců. Dílčími cíli teoretické části této práce jsou charakteristiky estrálních cyklů vybraných domestikovaných samic a popis možností detekce jejich plodných období chovatelem i laboratorními metodami, nejdetailněji u fen.

Cílem praktické části je srovnání stanovení sérového progesteronu u fen na analyzátoch Architect i2000SR od výrobce Abbott a Immulite 1000 od výrobce Siemens. Pomocí tohoto stanovení je mimo jiné možno s velkou přesností určit plodné dny feny. Oba analyzátory ke stanovení hormonu progesteronu využívají imunoanalytickou chemiluminiscenční metodu. Podcíli tedy bude charakteristika metody stanovení, jednotlivých analyzátorů a statistické vyhodnocení získaných dat pro porovnání obou analyzátorů.

## 4 METODIKA

### 4.1 Chemiluminiscence

Metoda chemiluminiscence patří mezi luminiscenční imunoanalýzy. Pojem luminiscence charakterizuje fyzikální jev, při kterém daná látka, tzv. luminofor, produkuje světelné záření. Původně stabilní sloučenina se dostane do nestabilního stavu s přebytkem vnitřní energie. Destabilizaci látky zapříčiní změny vnějšího prostředí, např. pH, teploty apod. Ke stabilizaci, návratu na základní úroveň, pak samovolně dochází díky postupnému uvolňování elektromagnetického záření o vlnové délce viditelného světla, tedy v rozmezí 380–760nm. [22] Při tomto ději dochází k excitaci fotonů. Světelné záření se měří v luminometru, který zaznamenává počet záblesků za minutu nebo za sekundu – CPM (counts per minute), CPS (counts per second). [23] Běžné luminometry obvykle nemají zdroj světla ani filtr před kyvetou; uspořádání za měřicí kyvetou je stejné jako u fluorimetrů, tedy filtr a fotonásobič. [17]

Chemiluminiscenční metody využívají ke stanovení takové luminofory, které produkují světelné záblesky na základě průběhu specifické chemické reakce. Mezi luminiscenční látky patří např. luminol, izoluminol, lucigenin, sulfonamidy či estery akridinových barviv. [22] Chemiluminiscence je tedy specifická excitací fotonů po průběhu chemické reakce vyvolané nástřikem syntetického činidla. [17]

Ve srovnání s jinými způsoby detekce umožňuje tato metoda nejvyšší možný stupeň citlivosti stanovení, v mnoha případech o řády vyšší než stanovení radioimunologickými metodami, tzv. RIA. [24] To platí nejen pro citlivost stanovení hormonu progesteronu, ale i široké spektrum dalších látek.

## 4.2 Abbott Architect i2000SR

Automatizovaný přístroj Architect i2000SR od výrobce Abbott Laboratories s.r.o. (dále jen Architekt) používá ke stanovení koncentrace analytu fotometrii, potenciometrii – tzv. *c* Systém přístroje, a **chemiluminiscenční imunoanalýzu na mikročasticích (CMIA)** – tzv. *i* Systém. *C* systém pracuje s daty o fotometrii a potenciometrii, zpracováním jednotlivých metod a s funkcí SmartWash. *I* Systém pak obsahuje informace o technologiích použitých k metodám měření analytů, algoritmech jednotlivých reakcí využívajících metodu CMIA a o optických systémech. [25]

*„Všechny imunoanalytické systémy ARCHITECT využívají detekční technologii CHEMIFLEX. Jde o druh chemiluminiscenční analýzy na paramagnetických mikročasticích používající značení konjugátu patentovaným derivátem akridinia, s možností různých měřících, tzv. flexibilních protokolů.“* [26, str. 26] Dvě patentované skupiny (sulfopropylová a sulfonamidová), které jsou navázané na molekulu akridinia, zlepšují rozpustnost a stabilitu reakční směsi ve vodním roztoku. Tyto skupiny tak zároveň i optimalizují některé funkční charakteristiky metody – např. kalibrační stabilitu, zvýšení sensitivity a rozšíření rozsahu metod. Tzv. flexibilní protokoly umožňují nastavit správné podmínky pro průběh stanovení jednotlivých analytů. To se děje u metod se standardním a zkráceným protokolem, metod s předpřípravou, jedním nebo dvěma promývacími kroky. [26]

**Metodou CMIA přístroj stanovuje** přítomnost antigenů (Ag), protilátek (Ab) a analytů ve vzorcích. Obecně mezi reaktanty esenciální pro zpracování jednotlivých metod CMIA patří: paramagnetické mikročastice potažené záchytovými molekulami (Ag, Ab či virovými částicemi), odpovídající stanovovanému analytu, akridiniový konjugát, Pre-Trigger – peroxid vodíku a Trigger – hydroxid sodný. [25]

V této kapitole je dále popsán princip stanovení progesteronu na přístroji Architect, technické parametry přístroje, zásady preanalytické fáze a možné interference, potřebné reagenty a materiál pro stanovení, zásady kalibrací a kontrol kvality, které je třeba provádět v pravidelných intervalech pro přesné stanovení hladin analytů, postup měření vzorku a v poslední řadě vyhodnocení výsledků měření.

### **Princip metody stanovení progesteronu**

Metoda ARCHITECT Progesterone je jedнокroková imunoanalýza vytvořená pro stanovení přítomnosti hormonu progesteronu v séru a plazmě pacienta. Pro stanovení přístroj využívá již výše obecně popsanou technologii Chemiflex.

Analyzovaný vzorek se smíchá s paramagnetickými **mikročásticemi** potaženými komplexem progesteronu, fluoresceinu a myších monoklonálních protilátek proti fluoresceinu a s **konjugátem** ovčích monoklonálních protilátek proti progesteronu s **akridinem**. Toto všechno tvoří reakční směs.

**Progesteron** původem ze vzorku pacienta **soutěží s progesteronem** v reakční směsi, kterým jsou potaženy mikročástice, o **vazebná místa** na ovčích monoklonálních protilátkách proti progesteronu značených akridinem, tedy **na konjugátu**. Vzniká tak tedy komplex protilátka-antigen-protilátka.

Po promytí se do reakční směsi **přidají roztoky Pre-Trigger a Trigger** a výsledné chemiluminiscenční **záření se měří** v relativních světelných jednotkách (**RLU** – Relative Light Units). Množství hormonu progesteronu ve vzorku pacienta je pak nepřímo úměrné signálu v jednotkách RLU, který je detekován optickým zařízením *i* Systému. [27]

## **Technické parametry přístroje**

Architect i2000SR je velkokapacitní analyzátor s výkonem až 200 analýz za hodinu. Chlazený karusel lze obsadit reagensiemi pro 25 metod stanovení. Modul je vybaven tzv. robotickým podavačem vzorků s maximální kapacitou 135 vzorkových pozic. Přístroj je konstruován pro případné připojení dalšího stejného modulu, čímž lze dosáhnout výkonu až 400 stanovení za hodinu a kapacitou 50 metod na palubě. [26]

Mezi hardwarové komponenty, ze kterých se Architect skládá patří podavač vzorků, zásobní centrum obsahující roztoky (2–11 °C), procesní centrum, ve kterém probíhají analýzy (36,4–37,6 °C) a řídicí jednotka SCC – počítač. Podavač vzorků má čtyři pipetovací kapsy, do nichž se umísťují stojánky a jeho součástí jsou i stojánky na zkumavky a šuplíky, do kterých se mohou stojánky vkládat. [25]

Výsledky všech provedených měření lze zobrazit na monitoru počítače přístroje a jsou kontinuálně zasílány do LISu. I System potřebuje pro 1 analýzu 2–200 µl vzorku. [25]

## **Preanalytická fáze a interference**

Ke stanovení progesteronu lze využít plazmu nebo sérum získané centrifugací žilní krve, odebrané standardním aseptickým způsobem, ideálně na lačno. Vzorek by se měl stanovit v co nejkratší době po odběru, aby se zabránilo odpařování vzorku. [25] V literatuře se uvádí, že u skladovaných vzorků v separačních zkumavkách s gelem může postupem času docházet k poklesu naměřených hodnot hormonu progesteronu – za 24 hodin pokles hodnot u vzorků ponechaných na gelu v průměru až o 13 %. Pro získání optimálních výsledků se dále doporučuje před vyšetřením odstranit případné bubliny ze vzorků. [27]

Mezi látky potenciálně způsobující interferenci při stanovení sérového progesteronu patří hemoglobin, bilirubin, triacylglyceroly a proteiny. [27]

### **Potřebné reagensie a spotřební materiál**

Dodávaný materiál v soupravě Architect Progesterone:

- ARCHITECT Progesterone Reagent Kit

Požadovaný materiál, který není součástí soupravy:

- ARCHITECT *i* System
- ARCHITECT *i* Assay CD-ROM
- ARCHITECT Progesterone Calibrators
- ARCHITECT Progesterone Controls
- ARCHITECT Progesterone Manual Diluent
- ARCHITECT *i* PRE-TRIGGER SOLUTION
- ARCHITECT *i* TRIGGER SOLUTION
- ARCHITECT *i* WASH BUFFER
- ARCHITECT *i* REACTION VESSELS
- ARCHITECT *i* SAMPLE CUPS
- ARCHITECT *i* SEPTUM
- ARCHITECT *i* REPLACEMENT CUPS



- Případně pipety a špičky [27]
- Rukavice

### **Kalibrace a kontrola kvality**

Kalibrace se provádí změřením kalibrátoru 1 a 2 v duplikátu, a to vždy s použitím reagenční soupravy nové výrobní šarže, nebo pokud se hodnoty kontrol nacházejí mimo rozmezí uvedených v příbalovém letáku, popřípadě dle standardů procesu kontroly kvality dané laboratoře.

Pro kontrolu metody Architect Progesterone se doporučuje provést nejméně jedenkrát test všech hladin kontrol v průběhu 24 hodin každého dne provozu laboratoře. [27]

### **Postup měření vzorku**

- Vložení vzorků ve stojancích (popř. stojánek v šuplících) do analyzátoru.
- Stisknutí klávesy RUN (zpracovat) a systém Architect *i* System pak provede následující funkce:
  - přemístění vzorku do pipetovací části,
  - vložení reagenční nádoby (RV – Reaction Vessel) do procesní části,
  - nasátí vzorku a jeho přenesení do RV,
  - posunutí RV o jednu pozici, přenesení mikročástic a konjugátu do RV
  - promíchání, inkubace a promytí reakční směsi,

- přidání roztoků Pre-Trigger a Trigger,
- změření emitovaného chemiluminiscenčního záření a na jeho podkladu stanovení množství progesteronu ve vzorku,
- odsátí obsahu RV do nádoby na tekutý odpad a přemístění RV do sběrné nádoby na pevný odpad,
- vypočtení výsledku. [27]

### Výsledky měření

Přístroj vydává výsledky metody Architect Progesterone v jednotkách ng/ml. Pro přepočtení výsledků na jednotky nmol/l systém využívá následující vzorec:

- $(\text{nmol/l}) = (\text{ng/ml}) \times 3,18$

Tato metoda využívá pro sestavení kalibrační přímky metodu prokládání čtyřparametrové logické křivky. [27]

### 4.3 Siemens Immulite 1000

Přístroj Immulite 1000 od výrobce Siemens (dále jen Immulite) provádí **chemiluminiscenční stanovení**, jehož celý proces je automatizovaný. Analyzátor může pracovat ve dvou režimech – Standard a Turbo. Oba režimy fungují v zásadě stejně, až na rychlost stanovení jsou zcela shodné. Každý režim však vyžaduje jinou testovací soupravu.

Systém Immulite využívá pro všechny typy stanovení jako pevnou fázi plastové **kuličky potažené protilátkou nebo antigenem** specifickým pro daný test. Kulička je uložena v patentovaném platovém pouzdře, v testovací jednotce (TU – Test Unit), která zároveň slouží jako reakční nádoba pro imunitní reakci, proces inkubace,

promývání a vývoj signálu. Dále je pro všechna stanovení potřebný **chemiluminiscenční substrát** (adamantyl dioxetan fosfát) a **reagencie značená alkalickou fosfatázou**. Reagenční karusel pojme až 12 metod stanovení.

Vzorek se nejdříve inkubuje s kuličkou a alkalickou fosfatázou, poté se reakční směs oddělí vertikálním odstředěním TU při vysokých otáčkách. Kapalný obsah (vzorek, přebytečná reagencie a promývací roztok) se tak oddělí do sousední odpadní komory, která je součástí TU. Po odstředění kulička zůstane bez zbytkového navázaného značení. Množství navázaného značení na kuličce se stanoví pomocí světla-produkujícího dioxetanového substrátu. Emitované světelné záření vytvořené při chemiluminiscenční reakci se změří fotonásobičem (PMT). Na rozdíl od reakcí s akridinium esterem, při které vznikne jen záblesk světla, reakce zesílená enzymem používaná v tomto analyzátoru produkuje dlouhotrvající záři. V posledním kroku systém vypočítá výsledek pomocí parametrů kalibrační křivky konkrétní šarže, které byly do systému zadány prostřednictvím čárových kódů soupravy.

Přístroj provádí **5 typů analýz**. Při **jednocyklové** analýze, kterou se stanovuje například T4 (hormon tyroxin produkovaný štítnou žlázou), TU zůstane před promýváním jednu otáčku v hlavním inkubačním karuselu. Při stanovení **dvoucyklovou** analýzou (např. TSH třetí generace – thyreotropní hormon produkovaný adenohypofýzou) TU zůstane před promýváním dvě otáčky v hlavním inkubačním karuselu. V průběhu **sendvičové (imunometrické)** analýzy se neznačený Ag naváže na imobilizovanou Ab a po přidání značené Ab je změřen. Množství zachycené Ab je přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tato stanovení mohou mít jeden nebo dva cykly a využívají se například pro TSH třetí generace. Při **kompetitivní** analýze (např. Total T4) značený a neznačený Ag soutěží o vazební místa na kuličce potažené Ab. Množství značeného Ag navázaného na Ab je pak nepřímo úměrné koncentraci neznačeného Ag. Toto stanovení může opět mít jeden nebo dva cykly. **Sekvenční** analýza, kterou

se stanovuje např. hladina hormonu progesteronu, využívá dvě reagensie A a B. Složky reakce se v průběhu dvoucyklového stanovení pipetují v různých časech a mezi jednotlivými cykly může být zařazeno i promývání. Reagensie B se pipetuje již v průběhu prvního cyklu. [24]

**Metodou chemiluminiscence přístroj stanovuje** přítomnost antigenů Ag, Ab a analytů ve vzorcích.

Obdobně jako tomu bylo u popisu přístroje Architect, i v této kapitole, věnující se analyzátoru Immulite, budou dále charakterizována následující témata: princip stanovení progesteronu na analyzátoru, technické parametry přístroje, zásady preanalytické fáze a možné interference, potřebné reagensie a materiál pro stanovení, zásady kalibrací a kontrol kvality, postup měření vzorku a vyhodnocení výsledků měření.

### **Princip metody stanovení progesteronu**

Metoda IMMULITE Progesteron pracuje na principu sekvenční imunochemické reakce. Vzorek v průběhu stanovení progesteronu projde dvěma 30minutovými cykly. Hormon lze stanovit ze séra či plazmy. Kulička vložená v TU je potažená polyklonálním králičím anti-progesteronem. [28]

### **Technické parametry přístroje**

Immulite v režimu Standard provede až 120 testů za hodinu. Získání výsledku u jednocyklového testu trvá 42 min, u dvoucyklového 72 minut. Vzorků vyhodnocených v režimu Turbo pak provede až 80 za hodinu – jednocyklový trvá méně než 15 minut, dvoucyklový méně než 22 minut. Chlazený reagenční karusel pojme reagensie pro 12 stanovení.

Immulite se skládá z hlavního inkubačního karuselu (37 °C), reagenčního karuselu, luminometru (37 °C), vstupu do analyzátoru, do kterého se vkládají vzorky a TU, pipetovacího dávkovače, pump, dekontaminační jednotky, počítače a dalších nutných komponent pro provoz a funkčnost přístroje. [24]

### **Preanalytická fáze a interference**

Pro tuto metodu se nedoporučuje využívat antikoagulant EDTA, která by ovlivnila výsledky měření. Rozsáhlá lipémie by mohla způsobit pokles progesteronu ve vzorku. Bilirubin v koncentraci do 200 mg/l přesnost stanovení neovlivní, obdobně jako červené krvinky oddělené od plazmy do koncentrace 15  $\mu\text{l/ml}$  ve vzorku. [28]

### **Potřebné reagentie a spotřební materiál**

Materiál dodávaný v soupravě:

- Progesteron testovací jednotky
- Progesteron reagentie – obsahují syntetický progesteron značený ligandem nebo alkalickou fosfatázou (z telecího střeva) konjugovanou s antiligandem v pufru
- Progesteron kalibrátory

Požadovaný materiál, který není součástí soupravy:

- Progesteron diulent vzorků – pro ruční ředění patientských vzorků
- Chemiluminiscenční substrát
- Promývací roztok a čistící roztok na jehly

- Zásobníky na zkumavky se vzorky (s čárovými kódy)
- Jednorázové zkumavky na vzorky
- Vícesložková trojúrovňová kontrola, destilovaná/deionizovaná voda
- Kontroly, pipety na přenos vzorků, rukavice [28]

### **Kalibrace a kontroly kvality**

Analyzátor využívá pro kalibraci uloženou kalibrační křivku ve spojení s dvoubodovou adjustací. Kalibrační křivky jsou pro každou šarži generovány výrobcem na jednom přístroji zpracováním replikátů každého standardu. Tyto standardy pokrývají celý rozsah stanovení dané metody a jejich počet závisí na analytu. Zpravidla se pohybuje mezi šesti až patnácti. Adjustory jsou nutné pro harmonizaci záblesků za vteřinu (CPS) na analyzátoru v provozu laboratoře a CPS na analyzátoru, který byl použit pro vytvoření kalibrační křivky. [24] Adjustaci jsme provedli vždy před začátkem měření.

Mezi charakteristiky, které tyto postupy umožňují patří: reprodukovatelné pipetování přístroje a přesné načasování všech kroků, prostředí s regulovanou teplotou a v poslední řadě prodloužená stabilita reagensů. [24]

### **Postup měření vzorku**

- Vložení vyšetřovaného vzorku, který byl přenesen z odběrové zkumavky do čistého plastového keříku, do držáku vzorků.
- Vložení držáku se vzorkem a za ním maximálně 5 TU (podle požadovaného počtu stanovení) do zakládajícího řetězu analyzátoru.
- Identifikace vzorku – manuální ve worklistu/ čtečkou čárových kódů.

- Stisknutí GO na panelu displeje analyzátoru, čímž se spustí následující algoritmy stanovení:
  - identifikace TU pomocí čárových kódů,
  - přesun TU do hlavního inkubačního karuselu,
  - přidání vzorku a reagentie pipetovacím dávkovačem do TU,
  - inkubace TU v hlavním karuselu při 37 °C po dobu 30 nebo 60 minut (8 nebo 16 minut v režimu Turbo) – stanovení progesteronu 60minut
  - přesun TU do promývací/odstřeďovací stanice, kde je odstraněn nenavázaný Ag nebo Ab,
  - přidání substrátu a přesun TU do řetězu luminometru,
  - inkubace pro maximální intenzitu světelného signálu při 37 °C po dobu 10 minut (6 minut v režimu Turbo),
  - změření počtu fotonů fotonásobičem (PMT),
  - vypočtení výsledku. [24]

### **Výsledky měření**

Výsledky měření progesteronu jsou uváděny v jednotkách ng/ml, jejich přepočet na nmol/l probíhá automaticky podle stejného vztahu jako u metody Architect Progesterone. Analytická citlivost přístroje je od 0,2 ng/ml (0,6 nmol/l). [28]

#### **4.4 Definice souboru vzorků a jejich zpracování**

Pro naši práci jsme náhodně vybrali vzorky krve odebrané dvaceti fenám. Všechny feny byly ve věku chovatelské dospělosti, v blíže nespécifikované fázi jejich estrálního cyklu. Odběry do zkumavek s gelem provedla jednotlivá pracoviště veterinárních ordinací v Praze. Z veterinárních praxí byly vzorky přepraveny v polystyrenových chladících boxech svozovými auty do laboratoře v ulici Jankovcova v Praze, společnosti Synlab czech s.r.o. (dále jen Synlab). Vzorky jsme dále zpracovali a vyhodnotili v laboratorní sekci biochemie a hematologie – na pracovišti biochemie. Po celou dobu s nimi bylo nakládáno dle SOP společnosti. Sběr dat probíhal v průběhu měsíce srpna 2016.

Do souboru nebyly zahrnuty vzorky znehodnocené, jejichž výsledky měření mohly být ovlivněny interferencí. Dále do výběru nebyly zařazeny vzorky fen s hormonální terapií.

Všechny vzorky byly po přijetí na oddělení klinické biochemie stočeny při 1200 g po dobu 10 minut a následně vyhodnoceny, nejdříve na analyzátoru Architect a poté Immulite. Séra fen byla vyhodnocena na obou analyzátořech v den jejich přijetí do laboratoře.

#### **4.5 Postup statistického zpracování výsledků**

Výsledky měření pro vzájemné porovnání metod Architect Progesterone a Immulite Progesteron získané z LIS budou dále statisticky zpracovány dle následujícího schématu:

- Ověření normálního (Gaussovského) rozložení dat.
- Charakteristika získaných dat – výpočet základních statistických veličin obou metod: počet hodnot v sadě, aritmetický průměr, medián,



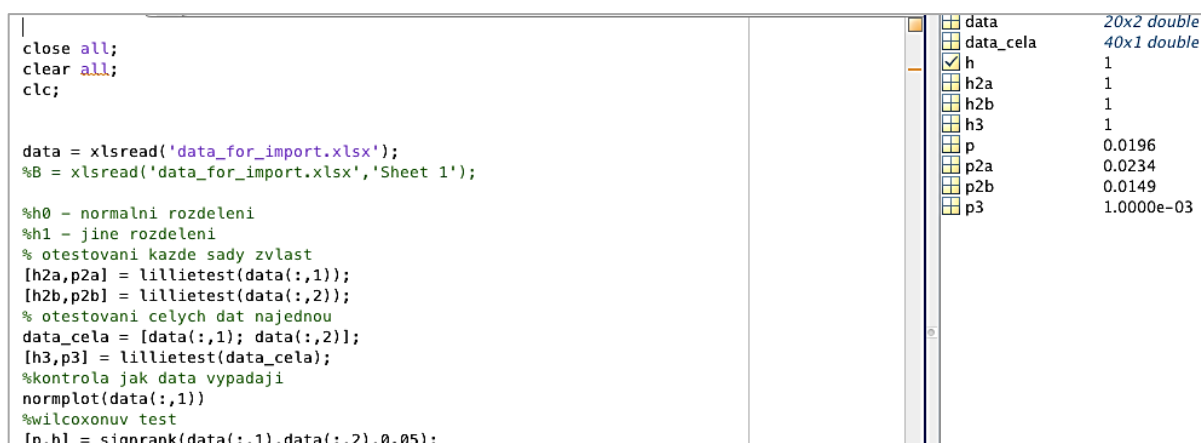
směrodatná odchylka sady výsledků (rozptyl), směrodatná odchylka průměru, minimum, maximum, rozpětí, kvantily.

- Vynesení dat do krabicového grafu pro zjištění odlehlých bodů.
- Vyhodnocení rozdílového grafu dle Altmana a Blanda.
- Graf lineární regrese – závislost výsledků měření metodou Architect Progesterone na výsledcích měření metodou Immulite Progesterone, vyhodnocení korelačního koeficientu. [29]
- Výběr testu hypotéz a jeho vyhodnocení.

## 5 VÝSLEDKY

Data získaná měřením jsou statisticky vyhodnocena v softwaru Excel 2016 a MATLAB\_R2016b. Výsledky měření jsou k nahlédnutí v příloze 4.

Nejprve jsme ověřovali **normální rozložení dat** výpočtem pomocí Lillieforsova testu, který lze použít pro soubor vzorků  $\leq 100$ , což je náš případ ( $n = 20$ ). Normální rozdělení dat jsme testem ověřili zvlášť u každé sady vzorků i u obou sad najednou. Ze všech třech výsledku testu shodně vyplývá (obrázek 2), že přijímáme alternativní  $H_1$  hypotézu, tedy, že rozdělení je jiné než normální (Gaussovské).



```
close all;
clear all;
clc;

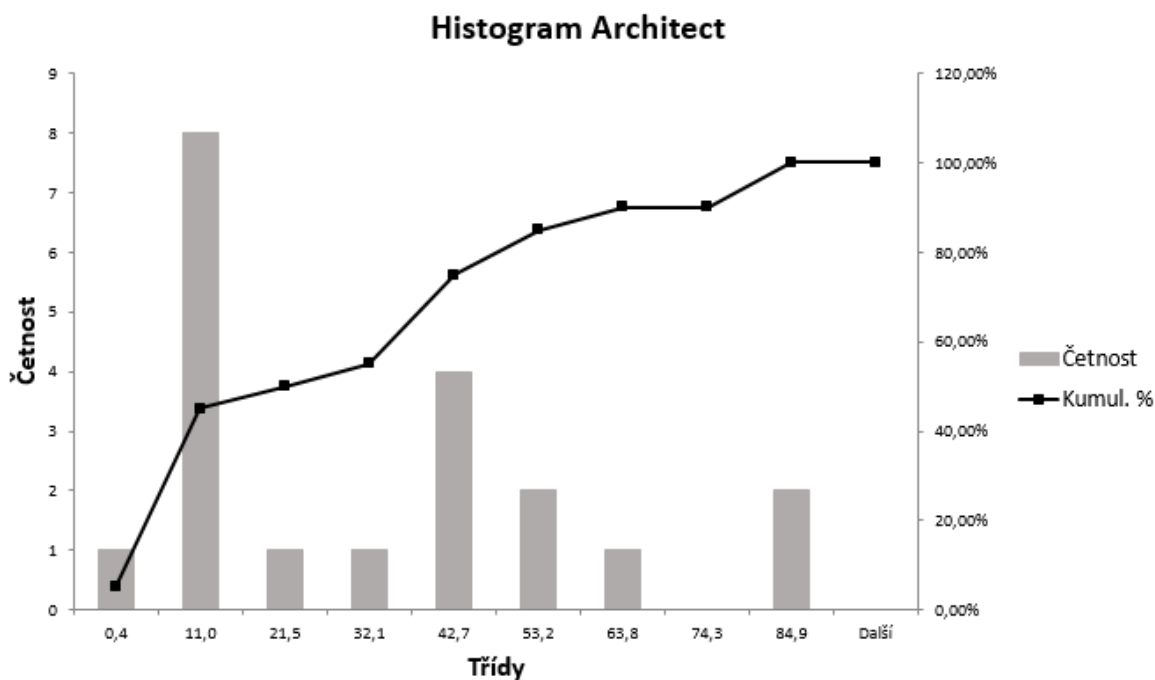
data = xlsread('data_for_import.xlsx');
%B = xlsread('data_for_import.xlsx','Sheet 1');

%h0 - normalni rozdeleni
%h1 - jine rozdeleni
% otestovani kazde sady zvlast
[h2a,p2a] = lillietest(data(:,1));
[h2b,p2b] = lillietest(data(:,2));
% otestovani celych dat najednou
data_cela = [data(:,1); data(:,2)];
[h3,p3] = lillietest(data_cela);
%kontrola jak data vypadaji
normplot(data(:,1))
%wilcoxonuv test
[ip,h] = signrank(data(:,1),data(:,2),0.05);
```

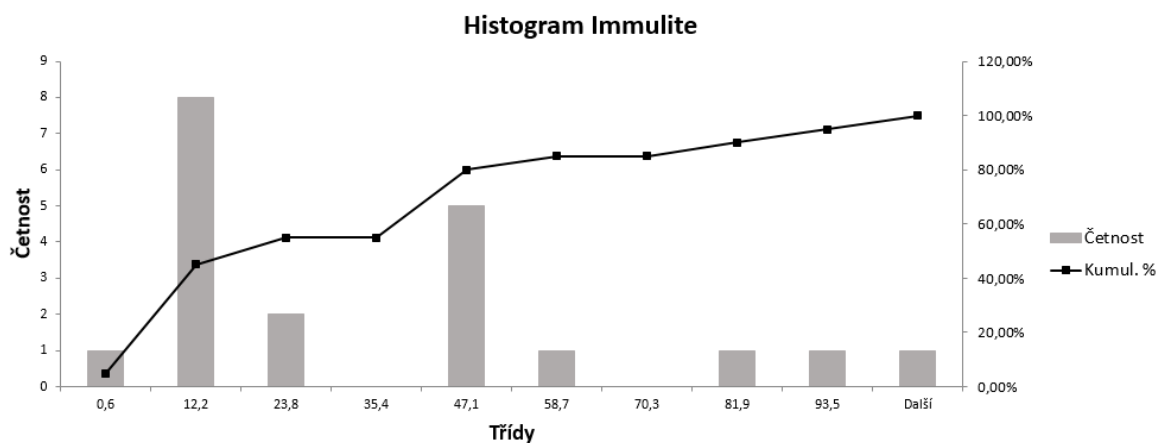
data	20x2 double
data_cela	40x1 double
h	1
h2a	1
h2b	1
h3	1
p	0.0196
p2a	0.0234
p2b	0.0149
p3	1.0000e-03

Obrázek 2 Lillieforsův test a p-hodnota

Pro názornost jsou zde uvedeny i **histogramy** (viz obrázek 3 a 4) pro vzorky měřené na obou analyzátorech, ze kterých je patrné rozdělení jiné než normální. Pokud by bylo rozdělení normální, tvar sloupců by alespoň přibližně opisoval tvar Gaussovy křivky. Graf kumulace četnosti nám kontroluje, že jsou v histogramu nevynechali část dat (celek 100 %).



Obrázek 3 Histogram vzorků měřených na analyzátoru Architect



Obrázek 4 Histogram vzorků měřených na analyzátoru Immulite

Protože jsme výpočty i histogramem ověřili jiné, než normální rozdělení naměřených dat nebudeme pro jejich popis využívat aritmetický průměr ani směrodatnou odchylku. Tyto parametry jsme nahradili výpočtem mediánu a kvantilů. **Hodnoty základních statistických veličin** pro měření na obou analyzátorech jsou zapsány v tabulce 3.

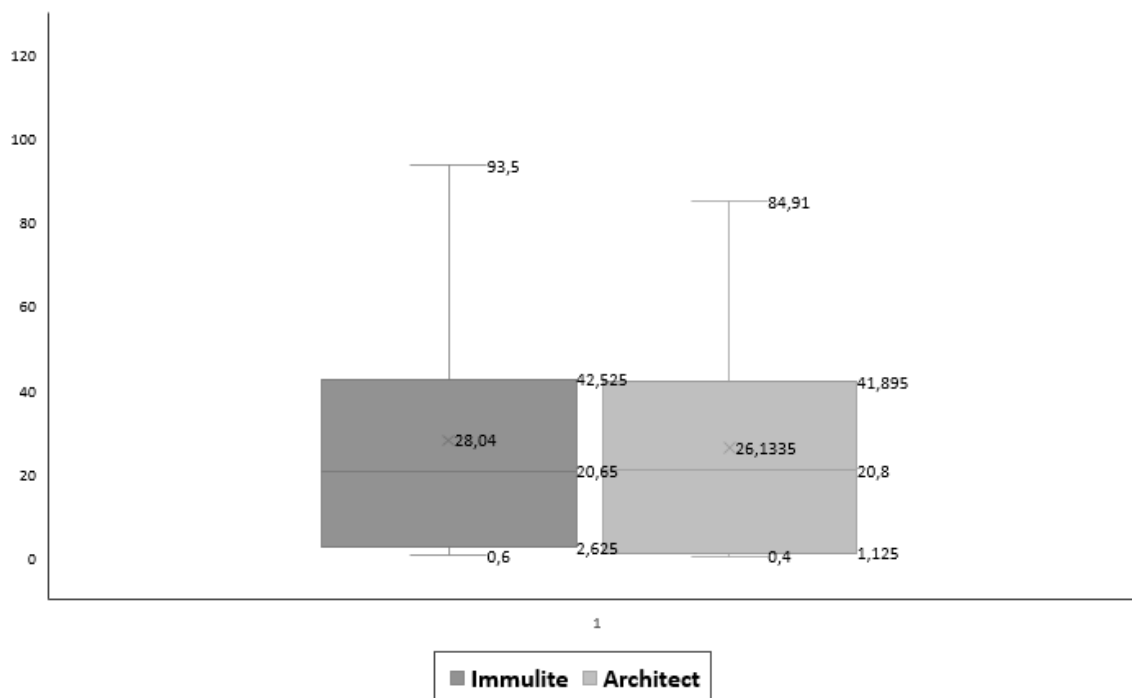
Tabulka 3 Základní statistické veličiny

Veličina	Immulite	Architect
počet hodnot v sadě n	20	20
minimum (nmol/l)	0,6	0,4
první kvartil (nmol/l)	2,625	1,125
medián (nmol/l)	20,6500	20,8000
třetí kvartil (nmol/l)	42,5250	41,8950
maximum (nmol/l)	93,5	84,91
rozpětí dat (nmol/l)	92,9	84,51

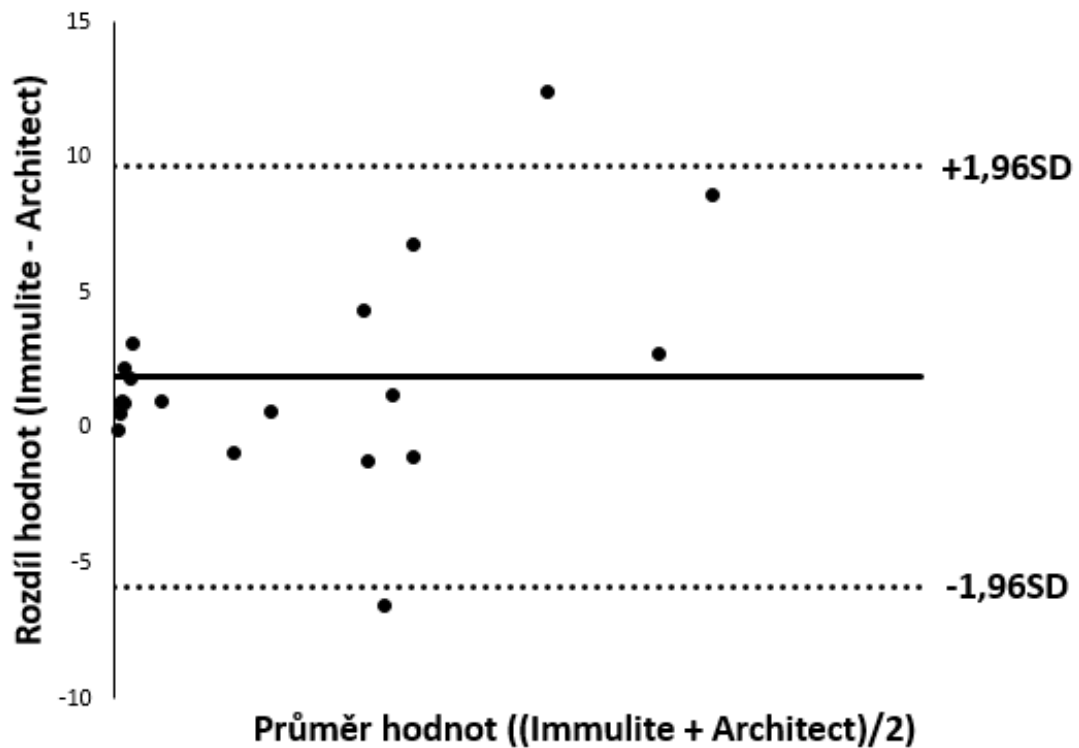
Z výsledků základních statických veličin (i zběžného pohledu na výsledky měření v příloze 4) je patrný trend rostoucích rozdílů se zvyšující se hladinou analyzovaného progesteronu. V tabulce 4 tento trend můžeme manifestovat na 6 nejmenších rozdílech – vzorek č. 6 (hladina 23,8 nmol/l), 12 (1,3 nmol/l), 14 (17,5 nmol/l), 15 (1,3 nmol/l), 17 (2,1 nmol/l) a 19 (0,6 nmol/l) a 5 největších rozdílech u vzorků č. 1 (34,8 nmol/l), 2 (37,1 nmol/l), 3 (93,5 nmol/l), 5 (48,1 nmol/l) a 18 (58,3 nmol/l).

Pro doplnění tabulky zde uvádím i **krabicové grafy** hodnot naměřeného progesteronu na analyzátoch Immulite a Architect (viz obrázek 5). Prostřední čáry v krabicích značí mediány, horní a dolní okraje krabic kvartily a „tykadla“ na obou stranách krabic minimum a maximum. Z grafů je patrné velké rozpětí výsledků měření, což potvrzuje naše očekávání (viz tabulka 2, ve které je v průběhu cyklu feny rozmezí od méně než 3,2 nmol/l až do 158,8 nmol/l), dále že většina hodnot měření leží v nižších hladinách, a že v sadě našich hodnot nejsou odlehlé body (tzv. outliers). Rozdíly mezi metodami lze sledovat i **Bland-Altmanovým rozdílovým grafem**. Na ose x jsou vyneseny průměry párů měření a na ose y rozdíly

párů naměřených hodnot na obou analyzátorech. Prostřední tlustá čára symbolizuje ideální nulové rozdíly a přerušované čáry násobek směrodatné odchylky rozdílů. I tento graf potvrzuje mírný trend rostoucích rozdílů měření mezi jednotlivými analyzátoři s rostoucími koncentracemi progesteronu ve vzorcích (obrázek 6).

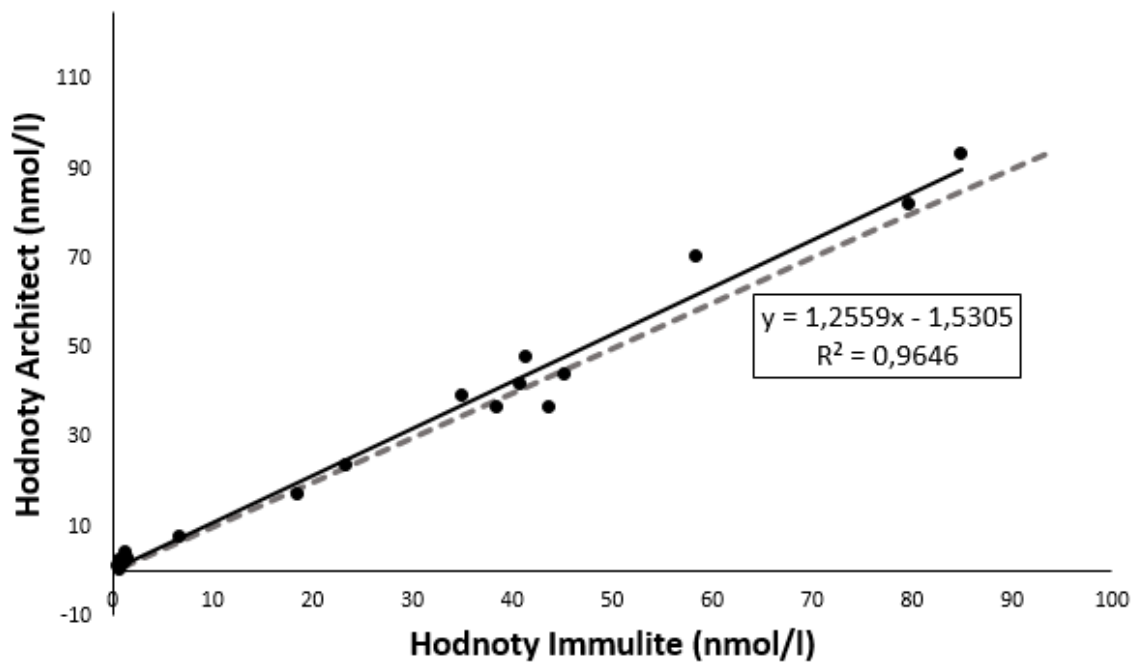


Obrázek 5 Krabicové grafy

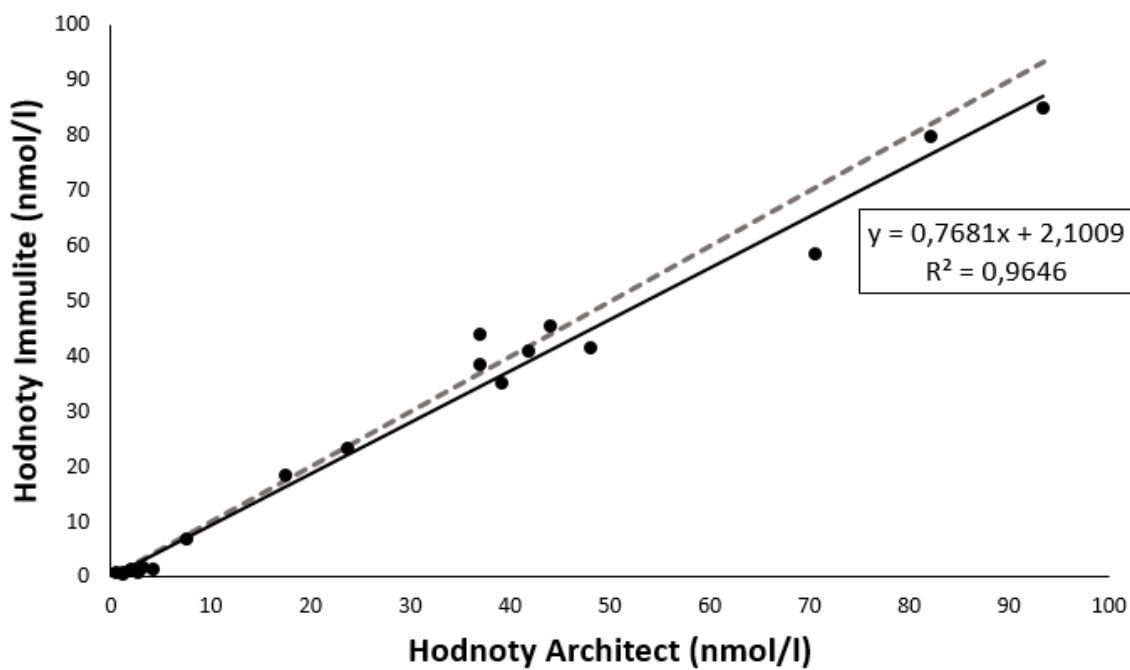


Obrázek 6 Bland-Altmanův rozdílový graf

Dalším nástrojem pro porovnání výsledků měření dvěma metodami je regresní přímka. Pokud by analyzátory měřily zcela shodně, hodnoty měření by byly umístěny na přímce s rovnicí  $y = x$  (přerušovaná šedá čára), přímka lineární regrese (černá nepřerušovaná) by tedy byla totožná s přímkou přerušovanou. Z obou obrázků grafů lineární regrese je patrné, že tomu tak není (viz obrázky 7 a 8), ale zároveň rozdíl mezi měřeními není až na tolik výrazný – přímky mezi sebou nemají velkou vzdálenost. Korelační koeficient popisující závislost mezi výsledky měření na obou analyzátoch je  $R = 0,9821$ , znamená tedy v našem případě velmi silnou.



Obrázek 7 Graf lineární regrese výsledků měření analyzátelem Architect na výsledcích měření na analyzátoru Immulite



Obrázek 8 Graf lineární regrese výsledků měření analyzátelem Immulite na výsledcích měření na analyzátoru Architect

Z důvodu jiného, než normálního rozdělení dat nevyužijeme ani t-test, který se k porovnání výsledků měření dvěma metodami obvykle využívá (pro porovnání průměrných hodnot).

Na místo t-testu jsme vybrali Wilcoxonův test, pro něj naše data splňují podmínky – počet vzorků  $\leq 100$ , je dvou-výběrový závislý a nevyžaduje normální rozdělení dat. Dvou-výběrový test volíme z důvodu porovnávání dvou metod, závislý neboli párový, protože byl měřen vždy 1 vzorek na 2 analyzátorech. V tomto testu ověřujeme platnost  $H_0$  hypotézy pro měřená data – mezi metodami není rozdíl (alternativní hypotéza  $H_1$  – mezi metodami je rozdíl). Výsledek testu srovnáváme s kritickou hodnotou pro náš počet vzorků, získanou z tabulek. Jestliže je výsledek menší než kritická hodnota, zamítáme  $H_0$  hypotézu. Test byl vypracován v programu Excel. V našem případě byl výsledek testu roven hodnotě 41 a kritická hodnota 51. Protože  $41 < 51$ , zamítáme  $H_0$  a přijímáme alternativní  $H_1$  na hladině významnosti 5 %. Tento výsledek nám tedy sděluje, že analyzátory neměří stejně. Výsledek Wilcoxonova testu vypočteného tabulkovým editorem jsme potvrdily i výpočtem p-hodnoty v programu MATLAB (obrázek 2). Hladinu významnosti jsme zvolili 0,05, což je tedy nejnižší hladina, na které na našich datech zamítáme  $H_0$  hypotézu. Protože naše hodnota vyšla 0,0196 (platí tedy  $0,0196 < 0,05$ ), zamítáme nulovou hypotézu  $H_0$  a přijímáme alternativní hypotézu  $H_1$  na hladině významnosti 0,05.



## 6 DISKUZE

Porovnání měření dvou analyzátorů se v laboratořích nejčastěji používá při potřebě nahrazení či doplnění staršího analyzátoru novým. Důvodem pro výměnu může být zastaralost analyzátoru, dlouhá doba stanovení, nárůst vzorků a potřeba výkonnějšího přístroje, změna či vývoj technologií, náročnost obsluhy, ekonomické důvody nebo i prostorová náročnost a jiné důvody specifické pro každou laboratoř.

Obdobně tomu bylo i v našem případě. Laboratoř zpracovávala veterinární vzorky na stávajícím analyzátoru Architect. Protože progesteron fen lze stanovovat se stejným vybavením i reagensiemi jako progesteron lidský, bylo možné menší počet vzorků stanovovat při běžném provozu humánní laboratoře. S nárůstem počtu vzorků a snahou rozšíření metod veterinárních stanovení však bylo třeba veterinární a humánní vyšetření oddělit. Proto došlo na úvahy, který analyzátor by byl pro veterinární stanovení vzhledem k potřebám dané laboratoře nejvhodnější. Dle technických, technologických, ekonomických, provozních a prostorových parametrů byl zvolen analyzátor Immulite 1000. Pro stanovení analytů využívá také chemiluminiscenční stanovení a progesteron lze opět diagnostikovat s pomocí humánních reagensií, jako tomu bylo u Architektu. Jeho další výhodou je možnosti stanovení hormonů T4, TSH a TLI (stanovení imunoreaktivity trypsinu) speciálními reagensiemi pro psi. Proto byl zvolen jako analyzátor pro sekci veterinárních stanovení v dané laboratoři.

K zavedení nové metody Progesterone Immulite tak bylo třeba srovnání se starší prováděnou metodou Architekt Progesterone. Srovnání laboratoř zajímá z důvodu ponechání původního referenčního rozmezí i možného dočasného využití humánního analyzátoru v případě výpadku Immulite, například z důvodu případné poruchy.

Z našich výsledků statistického porovnání všech 20 vzorků fen vyplynulo, že analyzátory v celém testovaném rozmezí stanovení neměří shodné, a že rozdíly ve stanovení mají tendenci růst se zvyšující se hladinou. V nižších hladinách jsou tedy výsledky porovnání přesnější. Největší rozdíly začaly v našem porovnání na hodnotách vzorku č. 1 (34,98 nmol/l), což bychom interpretovali dle tabulky 2 jako metestrus či graviditu. Toto porovnávání provádíme právě kvůli interpretaci hladin sérového progesteronu fen a stanovení jejich plodné fáze, proto je pro nás přesnost v nižších hodnotách (dle tabulky 2) důležitější než v hodnotách vyšších. Mohli bychom sice vybrat oblast zájmu přibližně do hodnoty 31,8 – 40 nmol/l, ale zajímalo nás srovnání v celém spektru stanovení.

Dle grafů lineární závislosti a korelačního koeficientu je patrné, že rozdíl v měření není příliš markantní a ve srovnání výsledku Wilcoxonova testu s tabulkovými hodnotami také není zcela vzdálený rozdíl hodnot.

Lze z toho tedy usuzovat, že v našem zájmu měření analyzátory měří s vyšší přesností v nižších hladinách sérového progesteronu, které nás pro určení plodné fáze samic nejvíce zajímají.

Pro semikvantitativní stanovení hladiny progesteronu v krvi lze využít také **rychlo-test**, např. Canine ovulation test od firmy Target, který může být vyhodnocen i mimo laboratoře, bez drahého přístrojového vybavení. Tento test je však v porovnání s RIA metodami pro stanovení hormonů častěji nepřesný. [14] A jak je již uvedeno výše, dnes využívané chemiluminiscenční metody jsou v porovnání s izotopovými ještě navíc o řády citlivější.

V následujících několika odstavcích se budeme věnovat již provedeným studiím, které hodnotí úspěšnost stanovení sérového progesteronu u fen s jinými metodami a také historii a vývoji imunoanalytických metod.

Podle odborné práce Kristíny Maškové (pod vedením MVDr. Romana Vitáska, Ph.D.) se metoda stanovení progesteronu z periferní krve chemiluminiscencí shoduje v určení plodné fáze feny s metodou vaginální cytologie u 57 % případů. Úspěšnost zabřeznutí feny po diagnostice progesteronovým testem je vyšší než 90 %, zatímco u vaginální exfoliativní cytologie je to pouze mezi 20–30 % (sledováno 49 fen). Metoda stanovení progesteronu je v rámci biologických možností velmi přesná, oproti tomu vaginální cytologie nadále bude pouze orientační a nápomocnou při sledování změn sliznice v průběhu estrálního cyklu a diagnostice onemocnění pohlavního ústrojí fen. [33]

Jiná studie provedená v rámci dvou let na 120 fenách, k určení vhodné doby pro jejich nakrytí používající metodu stanovení progesteronu v periferní krvi (chemiluminiscence) dokazuje ultrasonografickým vyšetřením mezi 25.–30. dnem březost u 93 fen (77,5 %) a nebřezost u 27 fen (22,5 %). U 14 nebřezích fen (52 %) byly zjištěny okolnosti vysvětlující jejich jalovost. U 3 případů byla z ejakulátu zjištěna neplodnost krycího psa, v 7 případech neprobíhalo krytí zcela normálně (vzájemná neochota k páření, agresivita feny, krátká doba krytí, nezkušenost zvířat či majitelů atd.), u 2 fen byl diagnostikován anovulační cyklus a u 2 fen pozdější krvavý vaginální výtok. Po vyloučení těchto 14 fen se úspěšnost metody v této studii zvýšila na 87,7 %. Ta však mohla být ještě vyšší z důvodu možné neplodnosti, onemocnění či vyčerpanosti krycích psů jalových fen. [19]

K určení vhodné doby krytí feny může být využito také stanovení LH, jeho bazální hodnota je nižší než 1 ng/ml. Bývá však zařazován spíše jako doplněk k celkové anamnéze, gynekologickým vyšetření, vaginální cytologii a stanovení hladiny progesteronu. [34]

Stanovení progesteronu v periferní krvi v období hárání feny je důležité také pro **určení termínu porodu fen**. V klinické praxi je tento postup využíván a je významně nápomocný k prevenci a minimalizaci reprodukčních ztrát. Pokud dojde

k prodloužení gravidity o více než 2 dny, placenta již není schopna zajistit dostatečnou výživu plodu a dochází k jeho odumření. Stanovení ideálního dne porodu pouze na základě dne krytí je značně nepřesné, protože fena je svolná k páření 2-3 dny a fertilizační schopnost spermií v reprodukčním ústrojí je i 6 dní. K predikci porodu lze mimo jiné použít ultrasonografické vyšetření, kterým se sleduje velikost plodů a vývoj orgánů, rentgenologickým vyšetřením postupující kalcifikaci kostěných struktur a zubů, avšak pravidelné měření koncentrace progesteronu v době říje fen je ze všech metod nejpřesnější. Při použití této metody dochází k porodu v rozmezí  $65 \pm 1$  den u 67 % fen,  $65 \pm 2$  u 90 % a v  $65 \pm 3$  dny u 100 % březích fen. Tuto zkušenost potvrzuje i studie MVDr. Vitáska a kol. provedena na 238 fenách (49 plemen) ve věku 2–8 let. Progesteron byl stanovován metodou chemiluminiscence. [35]

Pro stanovení hormonů jsou v dnešní době rutinně využívány **imunochemické metody**. Přestože název může evokovat představu jejich využití především v imunologii, opak je pravdou. Imunoanalýzy jsou hojně využívány na odděleních klinické hematologie a biochemie pro stanovení širokého spektra analytů. Všechny metody jsou značně citlivé a vysoce specifické, díky jejich založení na specifické reakci Ag-Ab; ke konečné detekci pak každá z nich využívá jinou technologii. [30] Metody tak lze rozdělovat do hlavních skupin podle systému uspořádání reakce, používaného značení nebo způsobu měření signálu. [31]

Dle uspořádání reakce se dělí na **kompetitivní** (Ag ve vzorku soutěží s Ag značeným o Ab; velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovované látky) a **nekompetitivní** (Ag ze vzorku je vylučován mezi dvě protilátky, které jsou v reakční směsi v přebytku; velikost signálu je přímo úměrná koncentraci stanovované látky). Dle značení a měřeného signálu na **radioimunoanalýzu** (kompetitivní – RIA, sendvičová – IRMA), **enzymoimunoanalýzu**, **fluoroimunoanalýzu** a **luminiscenční imunoanalýzu** (elektrochemiluminiscence, chemiluminiscence). [31]

V tomto a následujícím odstavci bych ráda zmínila ranné počátky a **postupný vývoj imunochemických metod**. Imunoprecipitace byla používána jako jedna z prvních základních imunochemických reakcí již na konci 19. století (1897), řádně kvantitativně od roku 1929 – institucí Kendalla a Heidelbergera, která dále rozvinula i základní sérologické reakce (precipitace, aglutinace, vazba komplementu, anafylaxe). Nástup imunodifúzních metod následoval po druhé světové válce. Imunoelektroforéza vznikla v roce 1953, jejíž modifikace na podložním sklíčku (1955) našla hojné využití v klinické laboratorní praxi. [30] Jako vedlejší produkt pozorování S. Bersona a R. Yalowové, kteří v 50. letech 20. století zkoumali metabolismus  $^{125}\text{I}$ -inzulínu u pacientů s diabetem, vznikla metoda RIA, která umožnila analýzu pikomolárních koncentrací analytů a v roce 1977 získala autorům Nobelovu cenu za lékařství. [32]

RIA je cenově výhodná, specifická a citlivá, lze jí využít ke stanovení široké škály analytů, ale zároveň je často náročná na ruční práci a zkušenosti laborantky a nelze opomenout ani komplikace spojené s prací s radioaktivními látkami (riziko působení ionizujícího záření na lidský organismus, nakládání s odpady atd.). [31] Mezi další komplikace této metody patří zkrácená doba použitelnosti reagensů související s poločasem rozpadu nuklidu a možnost znehodnocení imunoreaktivity značené látky v průběhu značení nebo skladování a speciální vybavení laboratoře. Z výše uvedených důvodů brzy začaly snahy hledat **jiné možnosti pro značení**. Mezi ně patřily bakteriofágy, enzymy, soli, latexy, krvinky, stabilní radikály, fluorescenční a luminiscenční sloučeniny. [32] Po jejich výzkumu na sebe nenechaly dlouho čekat jejich aplikace a dnešní široké uplatnění v klinických laboratořích.

## 7 ZÁVĚR

V teoretické části práce jsme splnili v úvodu vytyčený cíl krátké charakteristiky možností veterinárních stanovení v laboratorní praxi. Dále jsme se věnovali popisu estrálních cyklů vybraných samic savců a možnostem diagnostiky jejich plodné fáze. Reprodukční úspěšnost zaručuje ekonomickou prosperitu chovů domácích zvířat. Nejpodrobněji byly popsány charakteristiky estrálního cyklu feny. Nevhodné načasování krytí samcem bývá častým důvodem reprodukčního selhání. Přesné stanovení plodné fáze se doporučuje provádět u opakovaně nezabřezávajících fen, pokud je kryjící pes v delší vzdálenosti či zahraničí a také pro predikci dne porodu feny. V dnešní době je nejpřesnější metodou stanovení hladiny sérového progesteronu, které je zároveň i cenově dostupné a oproti jiným metodám stanovení méně náročné na provedení.

V praktické části bakalářské práce jsme popsali metodu chemiluminiscence a analyzátory Abbott Architect i2000SR a Siemens Immulite 1000, které tuto metodu využívají pro stanovení hladiny sérového progesteronu. Naším cílem bylo porovnání těchto dvou analyzátorů. To jsme provedli stanovením dvaceti vzorků krve fen na obou analyzátorech a statistickým vyhodnocením naměřených dat. Statistickými testy jsme zjistili, že analyzátory v našem rozsahu testovaných vzorků nestanovují hladinu sérového progesteronu stejně a z výsledků bylo patrné, že se zvyšující se hladinou progesteronu ve vzorcích roste neshodnost stanovení jednotlivými analyzátory. V nejnižších hladinách přístroje stanovovaly hladiny s menšími rozdíly, v hladinách nad 34,8 nmol/l rostly rozdíly měření. Pro správné určení plodné fáze feny jsou pro nás nejdůležitější právě hodnoty pod 31,8 nmol/l, ve kterých analyzátory měří s menšími rozdíly.

V diskusi jsou zmíněny práce dokazující až 90 % reprodukční úspěšnost fen díky stanovení hladiny progesteronu a důležitost tohoto stanovení pro predikci dne porodu. Je zde zmíněn i historický vývoj imunoanalytických metod.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
c	koncentrace
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích
CNS	centrální nervová soustava
CPM	záblesky za minutu (Counts Per Minute)
CPS	záblesky za sekundu (Counts Per Second)
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
g	tíhové zrychlení
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	gonadoliberin (Gonadotropin-Releasing Hormone), synonymum LHRH
H <sub>0</sub>	nulová hypotéza
H <sub>1</sub>	alternativní hypotéza
IRMA	sendvičová radioimunoanalýza
l	litr (jednotka objemu)

LH	luteinizační hormon
LHRH	hormon uvolňující luteinizační hormon, synonymum GnRH
mg	miligram (jednotka hmotnosti)
ml	mililitr (jednotka objemu)
ng	nanogram (jednotka hmotnosti)
nmol	nanomol (jednotka látkového množství)
P/E	přechod mezi proestrem a estrem
pg	pikogram (jednotka hmotnosti)
pmol	pikomol (jednotka látkového množství)
PMT	fotonásobič
RIA	radioimunoanalýza
RLU	relativní světelné jednotky (Relative Light Units)
RV	reakční nádobka (Reaction Vessel)
T4	tyroxin
TLI	stanovení imunoreaktivity trypsinu
Total T4	celkový tyroxin
TSH	thyreotropní hormon



TU            testovací jednotka (Test Unit)

$\mu$ l            mikrolitr (jednotka objemu)

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. WILLARD, Michael D., TVEDTEN, Harold. *Small Animal Diagnostics by Laboratory Methods*. Fifth edition. St. Louis: Elsevier Sanders, 2012. ISBN 978-1437706574.
2. Veterinární laboratoř Tierlab Ingolstadt, SRN (spolupracovali GRABNER, A., GUMPINGER, F.). *Směrné hodnoty důležitých laboratorních vyšetření pro domácí zvířata: pes, kočka, kůň, tele, skot, prase, ovce*. Vydání první. Přeložila Jindřiška Angerová. Jílové u Prahy: Vetpres – vydavatelství a.s. Biopharm – VÚBVL, 1994.
3. Sylab czech s. r. o. *Objednávka veterinárních laboratorních vyšetření*. [online]. In: Praha, 2016 [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: [http://www.synlab.cz/media/editor/files/35006\\_veterina\\_112016.pdf](http://www.synlab.cz/media/editor/files/35006_veterina_112016.pdf)
4. REECE, William O. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 1. čes. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 9788024732824.
5. KVAPIL, Roman a Renata KVAPILOVÁ. *Průvodce psí reprodukci*. Praha: Tok, 2007. ISBN 9788086177212.
6. NOAKES, David E., Timothy J. PARKINSON a Gary C. W. ENGLAND (ed). *Veterinary reproduction and obstetrics*. 9th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2009. ISBN 9780702028878.
7. MOMANI, Mohamad Shaker a Ivan ŠÁDA. *Základy chovu zvířat v TS I*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2010. ISBN 9788021320598.
8. PYCOCK, Jonathan F. *Otázky a odpovědi ve veterinární medicíně: Veterinární problematika reprodukce a chovu koní*. Přeložila Veronika Grymová, Irena Sekaninová a Petra Grygarová. Plzeň: Medicus veterinarius, 2004. ISBN 8090222455.
9. LOUDA, František. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic: metodika*. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., 2008. ISBN 9788087144053.

10. HEGEDŮŠOVÁ, Zdeňka, LOUDA, František, ŘÍHA, Jan a Jan KUBICA. *Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce*. Rapotín: Agrovýzkum Rapotín s.r.o., 2010. ISBN 9788087144213.
11. Kolektiv autorů. *Reprodukce prasat III., Sborník přednášek odborného semináře v Hradci Králové 2005*. Vydání první. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2005. ISBN 8073055201.
12. SVOBODA, Miroslav a Jaroslav DOUBEK. *Endokrinologie psa a kočky*. Brno: Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, 1998. ISBN 8090259502.
13. MAHELKOVÁ, Květoslava. *Zvěrolékař pro kočku, aneb, Kočka ve zdraví a nemoci*. Brno: Fauna Magazín, 2004. ISBN 80-903389-0-9.
14. NIEMAND, Hans G. a Peter F. SUTER a kol. *Klinická prax u psův, Klinická praxe u psů*. Přeložil Rudolf Böhm a kol. Bratislava: HaH, 1996. ISBN 8088700264.
15. TICHÁ, Vladimíra. *Malá škola pro chovatele psů*. České Budějovice: Dona, 2000. ISBN 8086136841.
16. KVAPIL, Roman a Renata KVAPILOVÁ. *Průvodce psí reprodukci*. Praha: Tok, 2007. ISBN 9788086177212.
17. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978807492062
18. VITÁSEK, R. et al. *Pohlavní cyklus a termínování krytí u feny: případové studie [CD]*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, 2012.
19. VITÁSEK, Roman a kol. *Zkušenosti s určováním vhodné doby krytí fen na základě koncentrace progesteronu v periferní krvi*. Veterinářství, 2001, roč. 51, č. 1, s. 9–11. ISSN: 0506-8231.
20. VERHOEF, Esther. *Chov psů*. Přeložila Šárka Kokolj. Dobřejovice: Rebo Productions CZ, 2005. ISBN 8072344005.
21. LÁZNIČKA, Alois. *Poševní cytologie v diagnostice reprodukčních stavů fen: postgraduální a praktická příručka pro veterinární lékaře*. 1. vyd. Brno: VŠVF, 1992.
22. BARTOŠ, Vladimír a kol. *Imunoanalytické metody a jejich využití v biomedicínském výzkumu a klinické praxi*. In: Imunoanalýza v klinické praxi:

- cyklus kurzů pro lékaře a odborné pracovníky ve výzkumu [online]. Plzeň: Lékařská fakulta, 2012, 85 s. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.imunokurzy.cz/studijni-materialy-kategorie/monografie.html>
23. TOMAN, Miroslav. *Veterinární imunologie. 2., dopl. a aktualiz. vyd.* Praha: Grada, 2009. ISBN 9788024724645.
  24. *Immulite 1000*. Návod k obsluze analyzátoru. Siemens.
  25. *Abbott Architect i2000SR*. Návod k obsluze analyzátoru. Abbott Laboratories.
  26. TRBUŠEK, J. *Analyzátory ARCHITECT firmy Abbott Laboratories*. FONS, 2008, roč. 18, č. 1, s. 25-28. ISSN: 1211-7137.
  27. *Progesterone, Architect system*. Příbalový leták k metodě. Abbott Laboratories, 2012.
  28. *Progesterone pro systémy Immulite a Immulite 1000*. Příbalový leták k metodě. Siemens, 2009.
  29. DOHNAL, Luděk. *Porovnání: Desatero pro porovnání výsledků dvou metod*. FONS, 2000, roč. 9, č. 3, s. 27-32. ISSN: 1211-7137.
  30. Masopust J., Doležalová V. *Základy imunochemických vyšetřovacích metod*. Praha: Informační služba SEVAC, 1976.
  31. ŠTERN, Petr a kol. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN: 8024610256.
  32. FINGEROVÁ, Helena a Miloslav TALAŠ. *Současný stav vývoje imunologických metod*. Časopis lékařů českých, 1987, roč. 126, č. 32, s. 993-997. ISSN: 0008-7335.
  33. MAŠKOVÁ, Kristína. *Porovnání metody poševní cytologie s metodou stanovení koncentrace progesteronu v periferní krvi u feny během hárání*. Brno, 2002. Odborná práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství.
  34. HOŠEK, Lubomír. *Stanovení luteinizačního hormonu (LH) při časování říje u fen*. Veterinářství, 2014, roč. 64, č. 7, str. 501-506. ISSN: 0506-8231.

35. VITÁSEK, Roman, PŘINOSILOVÁ, D. a A. BARTOŠKOVÁ. *Využití hodnot progesteronu při hárání k predikci termínu porodu fen.* Veterinářství, 2011, roč. 61, č. 2, s. 63-65. ISSN: 0506-8231.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura steroidního hormonu progesteronu, vlastní zdroj .....	30
Obrázek 2 Lillieforsův test a p-hodnota .....	50
Obrázek 3 Histogram vzorků měřených na analyzátoru Architect .....	51
Obrázek 4 Histogram vzorků měřených na analyzátoru Immulite .....	51
Obrázek 5 Krabicové grafy .....	53
Obrázek 6 Bland-Altmanův rozdílový graf .....	54
Obrázek 7 Graf lineární regrese výsledků měření analyzátozem Architect na výsledcích měření na analyzátoru Immulite .....	55
Obrázek 8 Graf lineární regrese výsledků měření analyzátozem Immulite na výsledcích měření na analyzátoru Architect.....	55

## 11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Shrnutí základních specifíků estrálních cyklů vybraných samic.....	16
Tabulka 2 Změny koncentrací progesteronu v průběhu estrálního cyklu feny.....	30
Tabulka 3 Základní statistické veličiny .....	52

## 12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Objednávka veterinárního laboratorního vyšetření


Příloha 2 Schématický diagram hormonálních změn v průběhu pohlavního cyklu u feny

Příloha 3 Biosyntéza progesteronu z cholesterolu


Příloha 4 Tabulka dat získaných měření



# Příloha 1 Objednávka veterinárního laboratorního vyšetření



SYNLAB  
smlab, czech s.r.o., Sokolovská 100/94, 186 00 Praha 8  
IČ: 49688804, IČZ: 06515000, call centrum: 800 800 234




Majitel/ Chovatel (tiskovým písmem)	Statim: ano <input type="checkbox"/>	Interpretace: ano <input type="checkbox"/>	ano <input type="checkbox"/>
Adresa:	hematologické <input type="checkbox"/> biochemické <input type="checkbox"/> sérologické <input type="checkbox"/>	histologické <input type="checkbox"/> parazitologické <input type="checkbox"/>	histologické <input type="checkbox"/>
PSC / MĚSTO:	jiné _____		
Fax / e-mail:	pes <input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> hlodavec <input type="checkbox"/> ptáček <input type="checkbox"/> fretka <input type="checkbox"/> jiné <input type="checkbox"/>	Zvíře	
Telefon:	Věk	Jméno	
Vzorky odebrat	Pohlaví		
(nazikolminky/ vet. lékař/ majitel)	Plemeno		
Číslo KV:	Číslo čipu/ tetování		
Fax / e-mail:	(užní číslo LUP)		
Telefon:	Označení výsledku:	email <input type="checkbox"/>	fax <input type="checkbox"/>
Datum/ čas odběru	Platba:	osobně <input type="checkbox"/>	fakturačně <input type="checkbox"/>
vzorků:	Vzorky	plná krev <input type="checkbox"/> sérum <input type="checkbox"/> orgán/část těla <input type="checkbox"/>	kuže/její deriváty <input type="checkbox"/> moč/určit <input type="checkbox"/> trus <input type="checkbox"/>
Místo odběru	Druh vzorků:	hemokultura <input type="checkbox"/> výtěr z ..... <input type="checkbox"/> jiné <input type="checkbox"/>	
vzorků (udovazu země původu):	Bližší popis/ množství:		

Ceník jednotlivých vyšetření naleznete v příloze.  **Chybné**

Jak vyplňovat:  **Správné**

Poznámka: \_\_\_\_\_



35006

www.synlab.cz

call centrum: 800 800 234

## OBJEDNÁVKA VETERINÁRNÍCH LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

Laboratorní profily mají zvířata

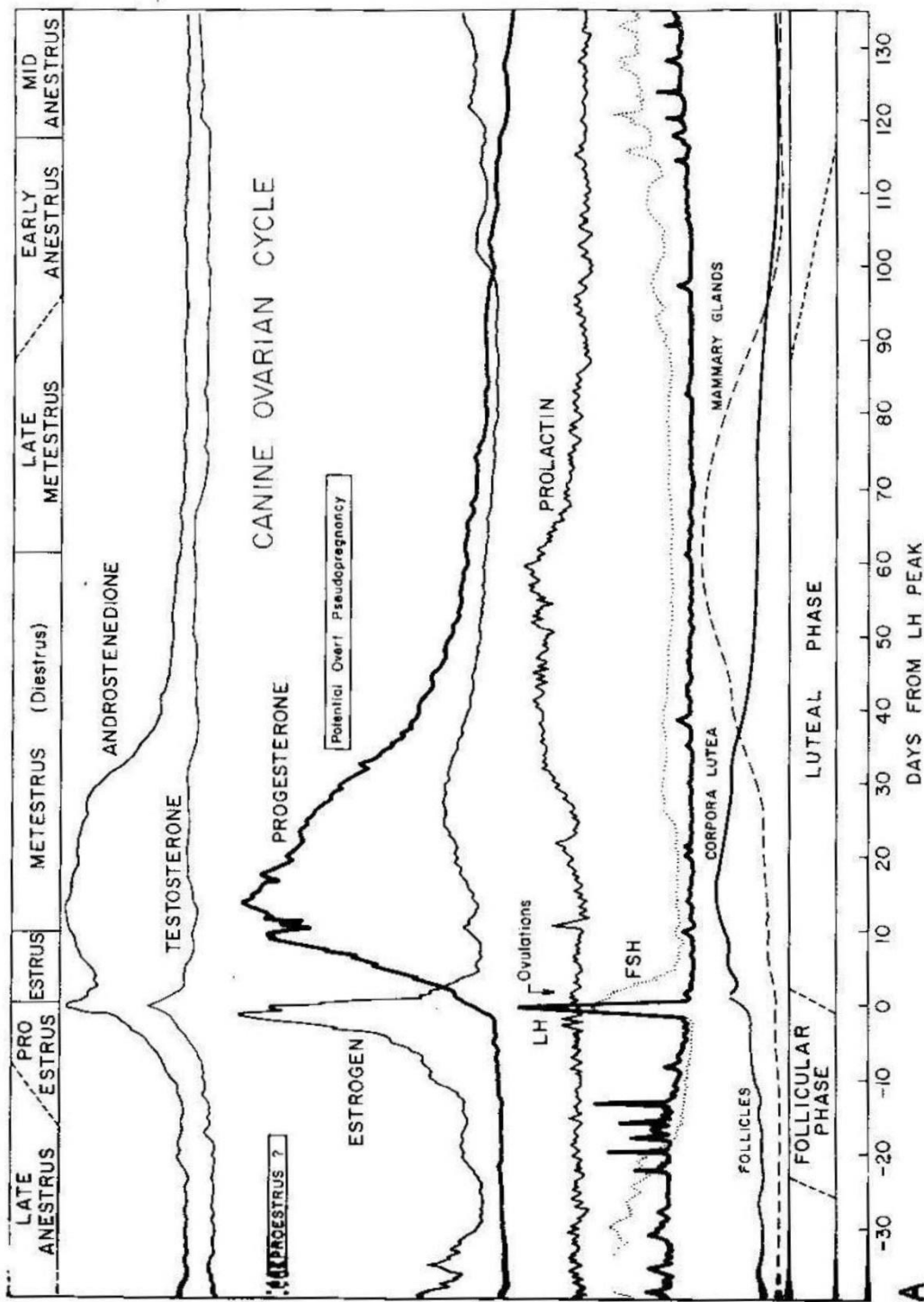
<input type="checkbox"/>	<b>Malý biochemický profil</b> (pes, kočka) – (ALT, ALP, urea, kreatinin, glukóza)
<input type="checkbox"/>	<b>Malý biochemický profil + krevní obraz základní</b> (pes, kočka) – (ALT, ALP, urea, kreatinin, glukóza); Ery, Leu, Plt, Hematokrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC
<input type="checkbox"/>	<b>Velký biochemický profil</b> (pes, kočka) ( <i>ε</i> -amyl, ALP, ALT, AST, CK, GMT, lipáz, albumin, glukóza, cholesterol, celková bílkovina, fruktosamin, celkový bilirubin, urea, kreatinin, triacylglyceroly, P, Mg, Ca, K, Na, Fe)
<input type="checkbox"/>	<b>Velký biochemický profil + krevní obraz+ přístrojový diferenciál</b> (pes, kočka) ( <i>ε</i> -amyl, ALP, ALT, AST, CK, GMT, lipáz, albumin, glukóza, cholesterol, celková bílkovina, fruktosamin, celkový bilirubin, urea, kreatinin, triacylglyceroly, P, Mg, Ca, K, Na, Fe); (KO + Neur, Lym, Mono, Eoz, Baz)
<input type="checkbox"/>	<b>Velký biochemický profil + krevní obraz+ mikroskopický diferenciál</b> (pes, kočka) ( <i>ε</i> -amyl, ALP, ALT, AST, CK, GMT, lipáz, albumin, glukóza, cholesterol, celková bílkovina, fruktosamin, celkový bilirubin, urea, kreatinin, triacylglyceroly, P, Mg, Ca, K, Na, Fe); (KO + Neur, tyč, Neur.segm., Lym, Mon, Eoz, Baz)
<input type="checkbox"/>	<b>Přehledová profil</b> (pes, kočka) – (ALT, urea, kreatinin, celková bílkovina, Ery, Leu, Plt, Hematokrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, Quick, APTT)
<input type="checkbox"/>	<b>Geriatrický profil</b> (pes, kočka) – (ALT, ALP, urea, kreatinin, celkový bilirubin, glukóza, cholesterol, Ca, Fe, Na, K, EFO, T4 + KO + přístrojový diferenciál)
<input type="checkbox"/>	<b>PU/PO profil</b> (pes, kočka) fruktosamin, kreatinin, glukóza, fruktosamin, cholesterol, ALP, ALT, Ca, P, T4 + KO
<input type="checkbox"/>	<b>Lehvnový profil</b> – (albumin, glukóza, celková bílkovina, urea, kreatinin, P, Ca, K, Na)
<input type="checkbox"/>	<b>Jaterní profil</b> – (ALP, ALT, AST, GMT, albumin, celková bílkovina, celkový bilirubin, celkový a přímý bilirubin)
<input type="checkbox"/>	<b>Pankreatický profil</b> – (TLI, Vte.B12, kyselina listová)
<input type="checkbox"/>	<b>Anemický profil</b> – (albumin, celková bílkovina, celkový bilirubin, Fe + KO + přístrojový diferenciál + retikulocyty)
<input type="checkbox"/>	<b>Speciální infekční profil</b> (kočka) (Velký biochemický profil + KO + přístrojový diferenciál + FIP, FIV, FeLV + EIFO)
<input type="checkbox"/>	<b>Profil šlístka žláza</b> (pes, kočka) – (TSH, T4, fT4)
<input type="checkbox"/>	<b>BARF profil</b> ( <i>ε</i> -amyl, ALP, ALT, AST, albumin, celková bílkovina, urea, kreatinin, P, Mg, Ca, K, Na, Cl + KO)
<b>Laboratorní profily — ostatní</b>	
<input type="checkbox"/>	<b>Přehledová profil</b> (ALP, AST, CK, LD, lipáz, albumin, cholesterol, celková bílkovina, žlučové kyseliny, kyselina močová, triacylglyceroly, P, Ca, K)
<input type="checkbox"/>	<b>Profil králík a morče</b> (AST, CK, GMT, celková bílkovina, glukóza, urea, kreatinin, triacylglyceroly, Ca, P + KO + přístrojový diferenciál)
<input type="checkbox"/>	<b>Profil fretka</b> ( <i>ε</i> -amyl, ALP, ALT, AST, CK, GMT, LD, albumin, celková bílkovina, glukóza, urea, kreatinin, triacylglyceroly, Ca, P + KO + přístrojový diferenciál)
<input type="checkbox"/>	<b>Profil plazi</b> (ALP, AST, CK, LD, lipáz, albumin, cholesterol, celková bílkovina, glukóza, žlučové kyseliny, kyselina močová, triacylglyceroly, P, Ca, K)

verze: 35\_006\_112016 © 2015 synlab.czech s.r.o.

Hematologie	Biochemie	Endokrinologie	Sérologie
<input type="checkbox"/> Krevní obraz z základní (Ery, Leu, Plt, Hematokrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC)	<input type="checkbox"/> Těžké kovy <input type="checkbox"/> Pb	<input type="checkbox"/> Svrtná žláza <input type="checkbox"/> TSH (Tyreotropin) <input type="checkbox"/> T4 (celkový tyroxin) <input type="checkbox"/> FT4 (volná T4) <input type="checkbox"/> Parathormon <input type="checkbox"/> Kalicitonin <input type="checkbox"/> Tyreoglobulin Ab (pes) <input type="checkbox"/> Endokrinologie <input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> pes <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophila (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia spp. (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Brucella canis (Ab) <input type="checkbox"/> Ehrlichia canis (Ab) <input type="checkbox"/> Hepesvirus (Ab) <input type="checkbox"/> Leishmania infantum group (Ab) <input type="checkbox"/> Leptospira spp. (Ab) <input type="checkbox"/> Neospora caninum (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (Ab) <input type="checkbox"/> Vakcinální protilátky (psinka, parvoviroza) <input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Krevní obraz + přístrojový diferenciál (Ery, Leu, Plt, Hematokrit, Hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, Neut, Lym, Mono, Eoz, Baz)	<input type="checkbox"/> Substráty <input type="checkbox"/> Albumin <input type="checkbox"/> Bilirubin celkový <input type="checkbox"/> Bilirubin přímý <input type="checkbox"/> Celková bilirubina <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Močovina <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Laktát <input type="checkbox"/> Žlučové kyseliny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> Leishmania infantum group (Ab) <input type="checkbox"/> Leptospira spp. (Ab) <input type="checkbox"/> Neospora caninum (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (Ab) <input type="checkbox"/> Vakcinální protilátky (psinka, parvoviroza) <input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Krevní skupiny (pes, kočka)	<input type="checkbox"/> Lipidy <input type="checkbox"/> Cholesterol <input type="checkbox"/> Triacylglyceroly <input type="checkbox"/> Ostatní parametry <input type="checkbox"/> Barbituráty <input type="checkbox"/> Fenobarbital <input type="checkbox"/> Fruktosamin <input type="checkbox"/> Osmolalita <input type="checkbox"/> CEA – karcinoembryonální antigen <input type="checkbox"/> CPSE – prostatická esteráza (pes) <input type="checkbox"/> IgE – pes (36 alergenů) <input type="checkbox"/> IgE – kočka (36 alergenů)	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Imunochemie <input type="checkbox"/> Coombsův test přímý <input type="checkbox"/> Coombsův test nepřímý	<input type="checkbox"/> Moč <input type="checkbox"/> Základní vyšetření (specifická hmotnost, pH, hustota, moč chemický sediment) <input type="checkbox"/> Blochemie moče <input type="checkbox"/> Amyláza <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Proteinurie <input type="checkbox"/> Urea <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Mikroalbuminurie <input type="checkbox"/> Kortizol/Kreatinin <input type="checkbox"/> Protein/Kreatinin ratio (UP/UQ) <input type="checkbox"/> Močové kameny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Hemokoagulace <input type="checkbox"/> Základní koagulace (PT, APTT, fibrinogen) <input type="checkbox"/> Rozšířená koagulace – (PT, APTT, trombnový test – TT, fibrinogen, antitrombin) <input type="checkbox"/> Protrombinový test – PT (Quick) <input type="checkbox"/> APTT <input type="checkbox"/> Trombinový test – TT <input type="checkbox"/> Fibrinogen <input type="checkbox"/> Antitrombin	<input type="checkbox"/> Moč <input type="checkbox"/> Základní vyšetření (specifická hmotnost, pH, hustota, moč chemický sediment) <input type="checkbox"/> Blochemie moče <input type="checkbox"/> Amyláza <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Proteinurie <input type="checkbox"/> Urea <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Mikroalbuminurie <input type="checkbox"/> Kortizol/Kreatinin <input type="checkbox"/> Protein/Kreatinin ratio (UP/UQ) <input type="checkbox"/> Močové kameny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Enzymy <input type="checkbox"/> α-amyláza <input type="checkbox"/> GMT <input type="checkbox"/> ALP <input type="checkbox"/> ALT <input type="checkbox"/> AST <input type="checkbox"/> Cholinesteráza <input type="checkbox"/> CK-kreatinínáza <input type="checkbox"/> Lipáza <input type="checkbox"/> LD <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg	<input type="checkbox"/> Moč <input type="checkbox"/> Základní vyšetření (specifická hmotnost, pH, hustota, moč chemický sediment) <input type="checkbox"/> Blochemie moče <input type="checkbox"/> Amyláza <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Proteinurie <input type="checkbox"/> Urea <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Mikroalbuminurie <input type="checkbox"/> Kortizol/Kreatinin <input type="checkbox"/> Protein/Kreatinin ratio (UP/UQ) <input type="checkbox"/> Močové kameny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Stopové prvky <input type="checkbox"/> Cu <input type="checkbox"/> Fe <input type="checkbox"/> Zn	<input type="checkbox"/> Moč <input type="checkbox"/> Základní vyšetření (specifická hmotnost, pH, hustota, moč chemický sediment) <input type="checkbox"/> Blochemie moče <input type="checkbox"/> Amyláza <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Proteinurie <input type="checkbox"/> Urea <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Mikroalbuminurie <input type="checkbox"/> Kortizol/Kreatinin <input type="checkbox"/> Protein/Kreatinin ratio (UP/UQ) <input type="checkbox"/> Močové kameny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)
<input type="checkbox"/> Parazitologie <input type="checkbox"/> Identifikace parazita <input type="checkbox"/> Kožní seškrapy (svrab a demodex) <input type="checkbox"/> Koprolgické vyšetření flotací <input type="checkbox"/> Koprolgické vyšetření sedimentační <input type="checkbox"/> Koprolgické vyšetření laroskopické <input type="checkbox"/> Dg. Cryptosporidium <input type="checkbox"/> Dg. Giardia intestinalis <input type="checkbox"/> Dg. Trichostrongylus axei	<input type="checkbox"/> Moč <input type="checkbox"/> Základní vyšetření (specifická hmotnost, pH, hustota, moč chemický sediment) <input type="checkbox"/> Blochemie moče <input type="checkbox"/> Amyláza <input type="checkbox"/> Glukóza <input type="checkbox"/> Kyselina močová <input type="checkbox"/> Kreatinin <input type="checkbox"/> Proteinurie <input type="checkbox"/> Urea <input type="checkbox"/> Na <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> Cl <input type="checkbox"/> Ca <input type="checkbox"/> Mg <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> Ostatní <input type="checkbox"/> Mikroalbuminurie <input type="checkbox"/> Kortizol/Kreatinin <input type="checkbox"/> Protein/Kreatinin ratio (UP/UQ) <input type="checkbox"/> Močové kameny	<input type="checkbox"/> Kůra nadledvčin <input type="checkbox"/> ACTH <input type="checkbox"/> Aldosteron <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Kortizol	<input type="checkbox"/> kočka <input type="checkbox"/> Anaplasma phagocytophilum (Ab) <input type="checkbox"/> Borrelia burgdorferi (IgG) <input type="checkbox"/> Chlamydia felis (Ab) <input type="checkbox"/> Calicivirus (Ab) <input type="checkbox"/> FIP (FCoV) (Ab) felinní koronavirus <input type="checkbox"/> FeLV (Ag, virus kočky leukózy) <input type="checkbox"/> FIV (Ab) virus kočky imunodeficiency <input type="checkbox"/> FeLV (Ag) + FIV (Ab) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgG) <input type="checkbox"/> Toxoplasma gondii (IgM, IgG) <input type="checkbox"/> Speciální vyšetření <input type="checkbox"/> Cestovní profil I – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) <input type="checkbox"/> Cestovní profil II – Babesia (Ab), Ehrlichia (Ab), Leishmania (Ab) + Dirofilaria immitis (Ag) <input type="checkbox"/> Přímý důkaz patogenu <input type="checkbox"/> Dirofilaria immitis (Ag)

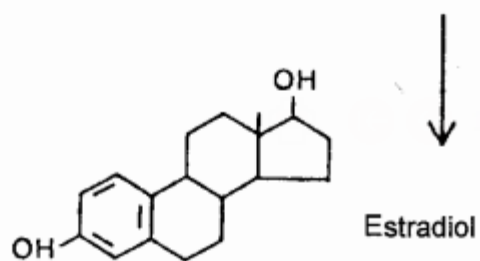
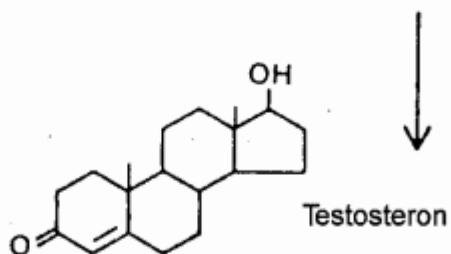
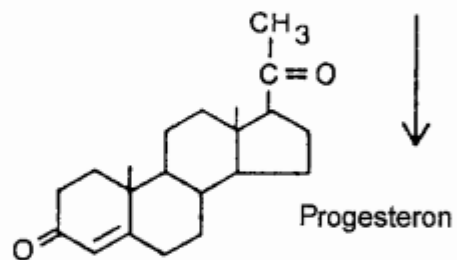
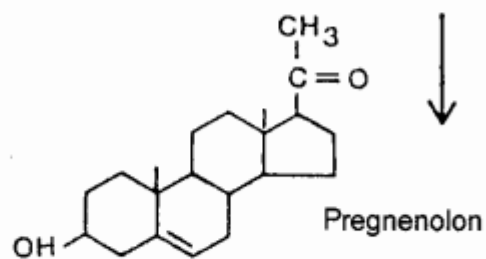
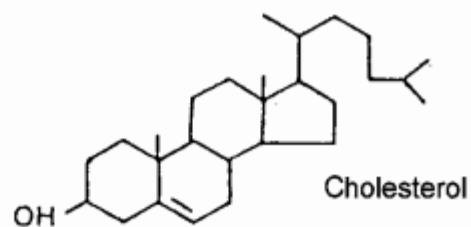


**Příloha 2** Schématický diagram hormonálních změn v průběhu pohlavního cyklu u feny



Zdroj: Concannon PW, Lein DH 1989

### Příloha 3 Biosyntéza progesteronu z cholesterolu



Zdroj: [4]

**Příloha 4** Tabulka dat získaných měření

<b>Číslo vzorku</b>	<b>ID vzorku</b>	<b>Immulite [nmol/l]</b>	<b>Architect [nmol/l]</b>	<b>Rozdíl</b>
1	1	39,3	34,98	4,32
2	2	37,1	43,68	-6,58
3	3	93,5	84,91	8,59
4	4	2,8	0,6	2,2
5	5	48,1	41,3	6,8
6	6	23,8	23,2	0,6
7	7	37,1	38,3	-1,2
8	8	44,1	45,2	-1,1
9	9	1,9	0,9	1
10	10	3,3	1,5	1,8
11	11	4,3	1,2	3,1
12	12	1,3	0,8	0,5
13	13	82,3	79,6	2,7
14	14	17,5	18,4	-0,9
15	15	1,3	0,4	0,9
16	16	7,7	6,7	1
17	17	2,1	1,2	0,9
18	18	70,7	58,3	12,4
19	19	0,6	0,7	-0,1
20	20	42	40,8	1,2