

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA TROPICKÉHO ZEMĚDĚLSTVÍ



Česká zemědělská univerzita v Praze
**Fakulta tropického
zemědělství**

**Neinvazivní diagnostika březosti u kopytníků:
klíčivost semen, Cubonihovo reakce, hormonální analýzy
a test s chloridem barnatým v moči a krystalizace slin**

Disertační práce

Autor: Ing. Iva Skálová

Školitel: prof. MVDr. Eva Baranyiová, CSc.

Konzultant: Ing. Tamara Fedorova, Ph.D.

Praha 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci na téma „Neinvazivní diagnostika březosti u kopytníků: klíčivost semen, Cubonihovo reakce, hormonální analýzy a test s chloridem barnatým v moči a krystalizace slin“ vypracovala samostatně pod vedením školitele a konzultanta disertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány a uvedeny v seznamu použité literatury na konci práce. Dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s vytvořením disertační práce neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.08.2017

.....

Iva Skálová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce paní prof. MVDr. Evě Baranyiové, CSc. za odborný dohled a skvělou spolupráci. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Satrapové, PhD. a Ing. Magdaléně Štolcové z Fakulty Agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, ČZU v Praze za poskytnutí pracovních podmínek pro realizaci výzkumu. Další poděkování patří Státnímu veterinárnímu ústavu v Praze za spolupráci.

Speciální poděkování uvádím pro Ing. Tamaru Fedorovou, PhD. za její čas, komentáře a celkovou spolupráci.

Dále děkuji Katedře chovu zvířat a potravinářství v tropech a celé Fakultě tropického zemědělství za možnost realizovat a dokončit tuto disertační práci.

Velké poděkování bych chtěla věnovat mým rodičům, rodině, partnerovi a přátelům za jejich podporu a trpělivost při realizaci disertační práce.

V poslední řadě děkuji Celouniverzitní interní grantové agentuře ČZU v Praze (číslo projektu: 51120/1313/3118) za finanční podporu mého výzkumu a publikací.

Abstrakt

Hlavním cílem této disertační práce bylo ověřit neinvazivní metody diagnostiky březosti u samic kopytníků jako jednoduché, uživatelsky přijatelné a ekonomicky nenáročné. Během testu klíčivosti klíčila semena fazolí mungo (*Vigna radiata*), pšenice špaldy (*Triticum spelat*) a pšenice seté (*T. aestivum*) na moči březích a nebřezích jalovic českého strakatého skotu. Dále byly u jalovic českého strakatého skotu, samic lam alpak (*Vicugna pacos*) a oslic (*Equus asinus*) otestovány diagnostické metody pomocí: 1) Cubonihio reakce, realizována na Státním veterinárním ústavu v Praze, 2) stanovení koncentrací 17 β -estradiolu (E₂), estron sulfátu (E₁S) a pregnandiol-3-glukuronidu (PdG) pomocí kompetitivní heterogenní enzymové imunoanalýzy, 3) test s chloridem barnatým (BaCl₂) po přidání 1% roztoku BaCl₂. Vyhodnocení krystalizace probíhalo s využitím slin holštýnského skotu. Pro otestování faktorů, které mohou krystalizaci ovlivnit byly použity sliny samic a samce velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*). V první fázi výzkumu klíčivosti semen bylo prokázáno potlačení klíčení mungo fazolí na moči březích jalovic zředěné 1:4 i 1:14 ($p < 0,01$). Oproti tomu více semen pšenice špaldy ($p < 0,05$) vyklíčilo na moči březích jalovic o koncentraci 1:14. Výsledky druhé fáze výzkumu ukázaly, že moč březích jalovic inhibovala jak počet vyklíčených semen ($p < 0,05$) tak i délku klíčků fazolí mungo ($p < 0,0001$). U pšenice seté byl pozorován opačný efekt ($p < 0,05$). U jalovic ani u lam alpak nebyl prokázán ($p > 0,05$) žádný vztah mezi výsledky Cubonihio reakce a skutečným reprodukčním stavem samic. U oslic byla potvrzena 100% spolehlivost Cubonihio reakce v označení březích samic v druhé polovině jejich březosti ($p < 0,01$). V moči březích jalovic byly naměřeny vyšší koncentrace všech tří stanovovaných reprodukčních hormonů než v moči nebřezích ($p < 0,0001$). Vyšší koncentrace E₁S ($p < 0,05$) byla naměřena v moči nebřezích lam alpak oproti březím. Vyšší koncentrace PdG ($p = 0,009$) byla potvrzena v moči březích oslic než v moči nebřezích. Byly potvrzeny pozitivní i negativní korelace mezi koncentracemi reprodukčních hormonů v moči a výsledky testu klíčivosti semen na zředěné moči jalovic ($p < 0,05$). Souvislost mezi výsledky testu s chloridem barnatým a skutečným reprodukčním stavem samic nebyla prokázána ($p > 0,05$) ani u jednoho ze sledovaných druhů. Krystalické útvary byly zaznamenány jak ve slinách holštýnských krav, tak i ve slinách velblouda dvouhrbého. Změna teploty při zasychání vzorků a změna koncentrace vzorku sliny byly vyhodnoceny jako faktory, které mohou ovlivnit krystalizaci ve slinách. Testované neinvazivní metody ukázaly jistý potenciál, ale jen některé z nich jsou spolehlivě aplikovatelné v praxi.

Klíčová slova: *Triticum aestivum*, *Vigna radiata*, test klíčivosti semen, Cubonihio reakce

Abstract

English title: Non-invasive pregnancy diagnosis in even-toed ungulates: The usage of urine examination by seed germination, Cuboni reaction and barium chloride test and saliva crystallization

This dissertation thesis aimed to verify noninvasive pregnancy diagnostic methods for females of even-toed ungulates as simple, user-friendly and low-cost. Mung beans (*Vigna radiata*), wheat seeds (*Triticum spelta* and *T. aestivum*) germinated in urine of Czech Fleckvieh heifers. Furthermore, 1) Cuboni reaction, performed by State Veterinary Institute, Prague 2) determination of urinary 17β -oestradiol (E2), oestrone sulphate (E₁S) and PdG concentrations using competitive heterogeneous enzyme immunoanalysis, 3) barium chloride (BaCl₂) test after addition of 1% BaCl₂ were tested in Czech Fleckvieh heifers, females of alpacas (*Vicugna pacos*) and jennies (*Equus asinus*). The phenomenon crystallization was evaluated in saliva of Holstein cows. Camels' saliva (*Camelus bactrianus*) was used for assessment of factors which can influence arborization in saliva. Inhibited mung beans germination ($p < 0.01$) on heifers' urine diluted 1:4 and 1:14 was proved in the first phase of study. In contrast, higher number of wheat seeds ($p < 0.05$) germinated in urine of pregnant heifers diluted 1:14. The second phase of presented study revealed that urine of pregnant heifers inhibited both the number of germinated mung beans ($p < 0.05$) and the length of their shoots ($p < 0.0001$). The results of wheat seeds germination showed the opposite trend ($p < 0.05$). No relationship ($p > 0.05$) was detected between the results of Cuboni reaction and real reproductive status of Czech Fleckvieh heifers and alpacas. However, 100% reliability of Cuboni reaction was determined ($p < 0.01$) throughout the second half of jennies' pregnancy. Higher ($p < 0.0001$) concentrations of all tested reproductive hormones were measured in urine of pregnant heifers than in non-pregnant ones. Higher concentration of urinary E₁S ($p < 0.05$) was determined in pregnant alpacas than in non-pregnant ones. Moreover, higher PdG urinary concentration ($p = 0.009$) was confirmed in pregnant jennies than in the non-pregnant ones. Furthermore, positive and negative correlations were confirmed between the results of seed germination test and urinary reproductive hormones concentrations ($p < 0.05$). No relationship ($p > 0.05$) was found between the results of barium chloride test and real reproductive status of observed females. Crystalline patterns were noticed both in cows' and camels' saliva. The different temperature during saliva samples drying and the change of saliva concentrations were evaluated as factors which can influence crystallization. The non-invasive techniques showed some potential, but not all of them are applicable in practice.

Key words: *Triticum aestivum*, *Vigna radiata*, seed germination test, Cuboni reaction

Obsah

1	Úvod.....	14
2	Cíle práce	16
3	Hypotézy	17
4	Literární rešerše.....	18
	Reprodukce kopytníků se zaměřením na skot, velbloudy, alpaky a osly	18
	Vnitřní pohlavní soustava	18
	Řízení reprodukce	21
	Hormonální řízení pohlavního cyklu.....	22
	Pohlavní cyklus	23
	Hormony související s březostí samic a porodem	24
	Porod	25
	Období puerperia.....	27
	Diagnostické metody související s reprodukcí	28
	Diagnostika říje	28
	Diagnostika březosti.....	29
	Invazivní diagnostika březosti	29
	Neinvazivní diagnostika březosti.....	32
	Další neinvazivní diagnostické metody	36
5	Materiál a metodika	39
5.1	Odběr vzorků	39
5.1.1	Diagnostika březosti z moči skotu	39
5.1.2	Diagnostika březosti z moči lam alpak a oslic	41
5.1.3	Diagnostika ze slin a faktory ovlivňující krystalizaci	42
5.2	Skladování vzorků a manipulace s nimi	42
5.2.1	Diagnostika březosti z moči	42
5.2.2	Krystalizace slin	43

5.3	Příprava a vyhodnocení vzorků	45
5.3.1	Diagnostika březosti z moči	45
5.3.1.1	Test klíčivosti semen.....	45
5.3.1.2	Cuboniho reakce	46
5.3.1.3	Analýza reprodukčních hormonů v moči.....	47
5.3.1.4	Test s chloridem barnatým.....	50
5.3.1.5	Semikvantitativní analýzy moči.....	51
5.3.2	Krystalizace slin	52
5.4	Statistické analýzy	55
5.4.1	Diagnostika březosti z moči českého strakatého skotu	55
5.4.2	Diagnostika březosti z moči lam alpak a oslic	55
5.4.3	Krystalizace slin	56
6	Výsledky	57
6.1	Diagnostika březosti z moči	57
6.1.1	Test klíčivosti semen.....	57
6.1.2	Cuboniho reakce.....	65
6.1.3	Analýza reprodukčních hormonů v moči.....	67
6.1.4	Test s chloridem barnatým	70
6.1.5	Semikvantitativní analýzy moči	71
6.2	Krystalizace slin	72
7	Diskuze	76
7.1	Test klíčivosti semen	76
7.2	Cuboniho reakce	79
7.3	Hormonální analýzy	79
7.4	Test s chloridem barnatým	81
7.5	Krystalizace slin	82
8	Závěr	84

9	Seznam použité literatury.....	86
10	Přílohy	103

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Uložení reprodukčních orgánů v těle samice skotu domácího

Obrázek 2: Uložení pohlavních orgánů v těle samice lamy

Obrázek 3: Uložení pohlavních orgánů v těle samice osla domácího

Obrázek 4: Poloha podélná přední (nahore), poloha podélná zadní

Obrázek 5: Abnormální pozice plodu

Obrázek 6: Transrektální sonografie u samice lamy alpaky (*Vicugna Pacos*)

Obrázek 7: Transrektální sonografie u samice velblouda jednohrbého (*Camelus dromedarius*)

Obrázek 8: Transabdominální sonografie u lamy alpaky

Obrázek 9: Odběr moči jalovic vleže

Obrázek 10: Odběr moči jalovic ve stoje

Obrázek 11: Odběr moči lam alpak

Obrázek 12: Vybavení pro odběr a přepravu vzorků slin holštýnského skotu

Obrázek 13: Znázornění systému vyhledávání krystalizace ve vzorku slin rozetřeného na podložním sklíčku

Obrázek 14a a 14b: Test klíčivosti semen

Obrázek 15: Rozmražené vzorky moči připravené k vlastní hormonální analýze

Obrázek 16: Vyhodnocení analýzy spektrofotometrem (VersaMax ELISA reader, Molecular Devices, USA) při vlnové délce $\lambda = 450 \text{ nm}$

Obrázek 17: vyhodnocení testu s chloridem barnatým

Obrázek 18: Vybavení pro semikvantitativní analýzu moči

Obrázek 19: Vyhodnocení semikvantitativních analýz moči

Obrázek 20: Hlavní typy krystalizace ve slinách holštýnského skotu

Obrázek 21: Ukázka atypické krystalizace ve slinách holštýnského skotu

Obrázek 22: Počet vyklíčených semen fazolí mungo na moči zředěné 1:4, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 23: Počet vyklíčených semen fazolí mungo na moči zředěné 1:14, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 24: Počet vyklíčených semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:4, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 25: Počet vyklíčených semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:14, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 26: Délka klíčů vyklíčených fazolí mungo na zředěné moči, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 27: Délka klíčků semen pšenice špaldy vyklíčených zředěné moči, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice

Obrázek 28: Hladina PdG v moči březích oslic během první, druhé a třetí třetiny březosti v porovnání s nebřezími samicemi

Obrázek 29: Výskyt typů krystalizace (%) ve slinách holštýnského skotu

Obrázek 30: Rozdíly v typu krystalizace mezi březími a nebřezími kravami v období 20-29 dní po inseminaci

Seznam tabulek

Tabulka 1: Délka březosti se zaměřením na domácí skot, velbloudy, lamy a oslice

Tabulka 2: Ředění vzorků moči českého strakatého skotu

Tabulka 3: Ředění vzorků moči lam alpak a oslic

Tabulka 4: Počet vyklíčených semen fazolí mungo a pšenice seté na zředěné moči březích a nebřezích jalovic v průběhu tří dnů testu klíčivosti semen

Tabulka 5: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích alpak

Tabulka 6: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích oslic, při rozdělení gestační periody na poloviny.

Tabulka 7: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích oslic, při rozdělení gestační periody na třetiny.

Tabulka 8: Koncentrace reprodukčních hormonů, jmenovitě estron sulfátu, 17 β -estradiolu a pregnandiolu-3-glukuronidu, v moči březích a nebřezích jalovic českého strakatého skotu

Tabulka 9: Korelace mezi naměřenými koncentracemi reprodukčních hormonů v moči jalovic a počtem vyklíčených semen

Seznam zkratk:

E2 - 17 β -estradiol

GnRH – gonadotropiny uvolňující hormo

PIF – prolactin inhibující faktor

ACTH – adrenokortikotropní hormon

FSH – folikulstimulující hormon

LH – luteinizační hormon

PGF_{2 α} – prostaglandin F_{2 α}

FTAI – fixed time artificial insemination

PMSG – gonadotropin séra březích klisen

RIA – radioimunoanalýza

EIA – enzymová imunoanalýza

ABA – kyselina abscisová

BaCl₂ – chlorid barnatý

Na – sodík

K – draslík

NaCl – chlorid sodný

H₂O – voda

E₁S – estron sulfát

PdG – pragnandiol-3-glukuronid

FTZ ČZU v Praze – Fakulta tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze

KCHZPT FTZ ČZU v Praze – Katedra chovu zvířat a potravinářství, Fakulta tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze

SVÚ Praha – Státní veterinární ústav Praha

KVD – Katedra veterinárních disciplín

Ag* - označený antigen

Ag – neoznačený antigen

O – žádná krystalizace

D – tečkovaná krystalizace

BL – větvičkovitá krystalizace

BL + FIL – větvičko-jedlovitá krystalizace

FIL – jedlovitá krystalizace

FIL + FEL – jedlovito-kaprad'ovitá krystalizace

FEL – kaprad'ovitá krystalizace

A – atypická krystalizace

SE – směrodatná chyba

1 Úvod

Monitoring reprodukce a diagnostika březosti patří mezi základní pilíře úspěšného chovu nejen hospodářských zvířat. Většina metod využívaných v dnešní době k diagnostice březosti zvířat se provádí za přítomnosti veterináře. V případě neochočených zvířat je zapotřebí zvířata imobilizovat či dokonce podání sedativa. Tyto metody bývají často stresující pro vyšetřovaná zvířata (Hafez & Hafez, 2000; Noakes et al., 2001; Gündoğan, 2009; Purohit, 2010). Podle přístupu ke zvířeti lze diagnostické metody rozdělit na invazivní a neinvazivní. Jako invazivní metody můžeme označit rektální palpaci nebo sonografické vyšetření *per rectum* (Hafez & Hafez, 2000; Noakes et al., 2001). Mezi neinvazivní diagnostické metody patří pozorovací metody prováděné chovatelem, jako například odmítání samce nebo nedostavení se další říje, dále laboratorní metody využívající neinvazivně odebrané vzorky (Bamberg et al., 1991; Purohit, 2010; Sathe, 2012; Volkery et al., 2012; Kumar et al., 2013) nebo vyšetřovací metody, jako například abdominální sonografie (Hunnam et al., 2009; Kleiman et al., 2010). Mnoho autorů vyhodnotilo odebírání moči zachycením do nádoby během spontánního močení jako vhodnou metodu, jak neinvazivně získat moč od několika druhů zvířat bez jejich imobilizace (Yang et al., 2003; Perumal 2014; Kubátová & Fedorova, 2016). Takto odebraná moč může být dále zpracována diagnostickými metodami, například testem klíčivosti semen v zředěné moči (Veena Ganesaiah, 2006; Narayana Swamy et al., 2010; Rine et al., 2014), Cuboniho reakcí (Von Locvančič, 1969; Haberová et al., 2011), stanovením koncentrací hormonů (Noakes et al., 2001; Domènech et al., 2011) nebo testem s chloridem barnatým (Ndu et al., 2000a; Ndu et al., 2000b; Lalrintluanga & Dutta, 2009).

Podle dostupných informací nejsou doposud studie, které by se zabývaly souvislostmi mezi klíčivostí semen a semikvantitativními analýzami moči. Pouze Dilrukshi a Perera (2009) otestovali souvislost mezi hodnotami pH moči krav a výsledky testu klíčivosti semen, avšak s negativními závěry. Rovněž nejsou dostupné studie zaměřené na souvislost mezi výsledky testu klíčivosti semen a reprodukčními hormony přirozeně se vyskytujícími v moči jalovic. Možné ovlivnění klíčivosti semen reprodukčními hormony testovali Nirmala et al. (2008), když semena klíčila v zředěných zásobních roztocích 17β -estradiolu (E2) a progesteronu, bez použití moči, avšak s negativními závěry. Zatím existuje předpoklad, že vyšší koncentrace fytohormonů potvrzená v moči březích samic, speciálně kyseliny abscisové (ABA), může být inhibujícím faktorem pro klíčení semen v zředěné moči (Veena & Narendranath, 1993; Veena et al., 2003; Veena Ganesaiah, 2006).

Sledování reprodukčního stavu pomocí krystalizace slin bylo popsáno hlavně u žen (Kullander & Sonesson, 1965; Guida et al., 1999). V dnešní době dokonce existují domácí testy na bázi krystalizace slin pro monitoring plodných dnů žen (MaybeBaby®). Pouze několik studií bylo zaměřeno na pozorování změn v krystalizaci slin u zvířat, např. Pardo-Carmona et al. (2010), Haberová (2010), Skalova et al. (2013), Kubátová a Fedorova (2016).

Dle dostupných informací existuje málo studií zabývajících se změnami krystalizace ve slinách zvířat, avšak nejsou studie zaměřené na testování různých faktorů, které by mohly krystalizaci ve slinách zvířat nějak ovlivnit.

Jalovice skotu domácího byly vybrány jako modelová zvířata pro otestování neinvazivních metod pro diagnostiku březosti z moči. V případě ověření spolehlivosti těchto neinvazivních technik by bylo možné je využít v oblastech, kde jsou běžné diagnostické metody nedostupné nebo také v zájmových chovech skotu pro odlišení březích a nebřezích samic. Vzhledem k tomu, že Cubonihova reakce a test s chloridem barnatým byly již testovány u velbloudů (Fedorova et al., 2015) a především využití Cubonihovy reakce má jistý potenciál, byly do testování neinvazivních metod v rámci disertační práce zařazeny i samice lam alpak. Cubonihova reakce je hojně využívána k označení březích klisen, ale její použitelnost k diagnostice březosti oslic prozatím nebyla publikována. Z tohoto důvodu se autorka rozhodla kromě sudokopytníků zahrnout do disertační práce i zástupce lichokopytníků.

Stejně jako v případě diagnostických metod z moči, tak i pro hodnocení krystalizace slin v různých reprodukčních stádiích byly krávy holštýnského skotu vybrány jako modelová zvířata. Sliny velblouda dvouhrbého, bez ohledu na pohlaví zvířete, byly využity pouze k vyhodnocení faktorů, které mohou ovlivnit krystalizaci již během přípravy vzorků.

2 Cíle práce

Hlavním cílem bylo ověřit neinvazivní metody jako uživatelsky přijatelné, ekonomicky nenáročné a jednoduché pro diagnostiku březosti u samic kopytníků.

Dílčí cíle disertační práce byly následující:

- i. Stanovit, která z metod je nejpřesnější.
- ii. Vyhodnotit, zda parametry moči hodnocené semikvantitativními analýzami mohou ovlivnit klíčivost semen.
- iii. Určit, zda reprodukční hormony přirozeně se vyskytující v moči samic mohou mít vliv na klíčivost semen.
- iv. Zhodnotit pH a specifickou hmotnost moči březích a nebřezích samic jako doplňující charakteristiky.
- v. Vyhodnotit krystalizaci slin u sudokopytníků.
- vi. Stanovit faktory, které mohou ovlivnit krystalizaci slin.
- vii. Porovnat zmíněné neinvazivní metody pro diagnostiku březosti druhů a kulturních plemen kopytníků.

3 Hypotézy

- i. K diagnostice březosti samic kopytníků bude možné využít neinvazivní laboratorní metody.
- ii. Testem klíčivosti semen v zředěné moči se dosáhne lepších výsledků pro diagnostiku v první polovině březosti než Cuboniho reakcí a testem s chloridem barnatým.
- iii. Koncentrace reprodukčních hormonů v moči březích samic a v moči nebřezích bude rozdílná.
- iv. Rozdílné koncentrace reprodukčních hormonů v moči březích a nebřezích samic budou souviset s výsledky testu klíčivosti semen.
- v. Hodnoty pH a specifické hmotnosti moči se budou lišit mezi březími a nebřezími samicemi.
- vi. Výsledky semikvantitativních analýz moči budou souviset s výsledky testu klíčivosti semen.
- vii. Krystalizace slin bude odlišná u březích a nebřezích samic.
- viii. Testované faktory budou mít vliv na krystalizaci slin.

4 Literární rešerše

Reprodukce kopytníků se zaměřením na skot, velbloudy, alpaky a osly

Schopnost vlastní reprodukce patří k základním znakům živých organismů. Správný management reprodukce, ať už hospodářských zvířat nebo nedomestikovaných zvířat chovaných v lidské péči, patří mezi rozhodující faktory v jejich chovu. Z vnějších vlivů působících na reprodukci se jedná především o mikroklima, výživu, technologii ustájení aj. (De Kruif, 1978; Ball & Peters, 2004; Bouška et al., 2006).

Reprodukční funkce u samic plní funkci produkce pohlavních buněk a poskytnutí vhodného prostředí pro růst a vývoj plodu.

Vnitřní pohlavní soustava

Vnitřní pohlavní ústrojí samic kopytníků se skládá z vaječníků, vejcovodů, dělohy a pochvy (Ball & Peters, 2004).

Vaječníky (*ovaria*) jsou párové samičí pohlavní žlázy produkující samčí pohlavní buňky (vajíčka). Dále secernují pohlavní hormony, které podmiňují pohlavní znaky zvířete a vyvolávají pohlavní cykly. Na začátku pohlavní dospělosti na jejich povrchu dozrává velký počet folikulů. Na povrchu vaječníku je ovulační plocha tvořená zárodečným epitelem, v němž se v embryonálním období formují a dále během života zrají folikuly. Vajíčka rostou a vyvíjí se ve folikulech. Každé ovarium je volně zavěšeno v kaudální části dutiny břišní na závěsném vazu vaječnickovém. Uložení, velikost, tvar, vzhled povrchu a hmotnost vaječníků závisí na druhové příslušnosti, stádiu reprodukčního cyklu a věku. U domácího skotu kryje pobříšnice jen malou část vaječníků, takže většinu plochy tvoří volný okraj, na kterém ovulují vyztřelé folikuly. Parenchymatózní vrstva pod epitelálním povrchem vaječníků obsahuje folikuly v různém vývojovém stádiu. V této vrstvě se také vytvářejí specifické samičí hormony, a to estrogen ve stěnách folikulů a progesteron ze žlutého tělíska, které vzniká na místě ovulovaného folikulu samice (Hafez & Hafez, 2000; Ball & Peters, 2004; Reece, 2013). Tvar vaječníků se mění v závislosti na přítomnosti Graafova folikulu nebo žlutého tělíska. U skotu domácího je ovarium dlouhé asi 3-4,5 cm, široké 1,5-2 cm a hmotnost bývá kolem 15-20 g. Samice velbloudů mají vaječníky dlouhé 3 cm a široké 2 cm, jejich hmotnost se pohybuje mez 4 až 5 gramy. Pokud se na ovariu vyskytuje Graafův folikul nebo žluté tělísko, může vaječník dosáhnout hmotnosti mezi 5,5-8 g (Abdalla, 1965). Oslice mají vaječníky dlouhé 6 – 8,8 cm vážící 60-80 g (Renner-Martin et al., 2009).

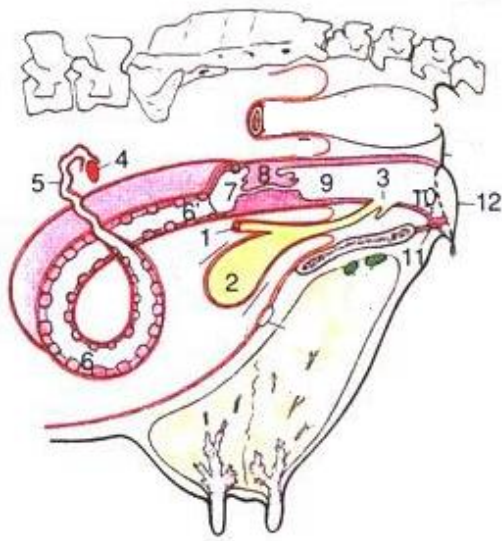
K vaječníku přiléhá nálevkovitá část vejcovodu (*tuba uterina*). Rozšířená část nálevky vejcovodu se upíná na vaječník a druhá část se postupně zužuje a přechází do děložního rohu. Vejcovod je trubice vystlaná sliznicí, která přivádí vajíčko od vaječníku do příslušného děložního rohu. Vnitřní strana je vystlána sekrečními a řasinkovými buňkami, které vytvářejí vhodné prostředí pro přežití spermií. Ve vejcovodech dochází k zachycení ovulovaného vajíčka (oocyty) a následnému procesu oplození. U skotu domácího je vejcovod dlouhý 20-30 cm, u velbloudích samic 17-28 cm a u klisen 18-30 cm (Abdalla, 1967; Ball & Peters, 2004; Anderson, 2013).

Děloha (*uterus*) je silnostěnný orgán, který poskytuje prostředí k vývoji nového jedince z oplozeného vajíčka až do narození mláďete. Děloha hospodářských zvířat se skládá ze tří částí: děložní krček (*cervix uteri*), děložní tělo (*corpus uteri*) a děložní rohy (*cornua uteri*) (Ball & Peters, 2004; Reece, 2013). Domácí skot, velbloudovití i koňovití mají tzv. dvourohý typ dělohy (*uterus bicornis*) (Musa & Merkt, 1990; Anderson, 2013; Reece, 2013). Uložení a velikost dělohy závisí na druhové příslušnosti, věku samice a funkčním stavu samotného orgánu (v období březosti se děloha výrazně zvětšuje). Stěna dělohy se skládá ze tří vrstev: slizniční, svalová a serózní. V období před placentací poskytují výměšky z děložních žláz výživu pro embryo (Ball & Peters, 2004).

Děložní krček je kaudálním pokračováním děložního těla a s výjimkou říje a porodu je pevně uzavřen. Zevní branka děložního krčku ústí do pochvy (Hoard's Dairyman, 1996; Reece, 2013). V případě domácího skotu měří děložní krček u jalovic 2-3 cm zatímco u dospělých krav až 10 cm. Během luteální fáze a březosti je v děložním krčku přítomen nahnědlý sekret. Hlen děložního krčku hraje u skotu významnou roli jako ukazatel probíhající říje (Ball & Peters, 2004).

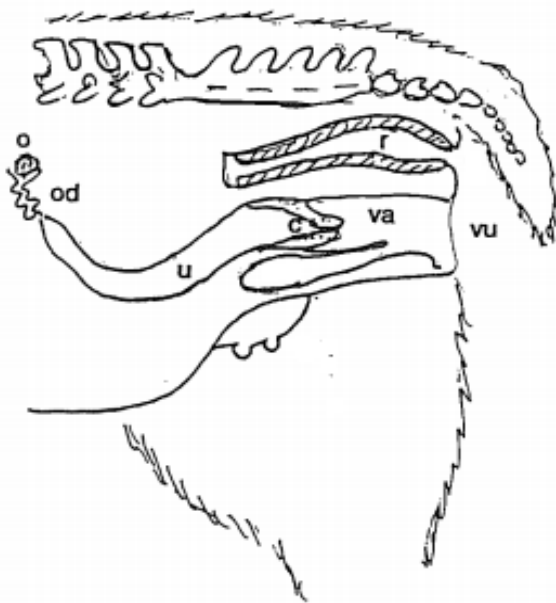
Pochva (*vagina*) je prostorná trubice uložená v pánevní dutině, která tvoří propojení mezi dělohou a vulvou. Pochva slouží pro příjem samčího pářícího orgánu (penisu) během kopulace a její velikost je variabilní v závislosti na tom, zda je samice březí či nikoli (Reece, 2013; Ball & Peters, 2004).

Uložení samičích reprodukčních orgánů v těle samic domácího skotu, lamy a osla domácího je vyobrazeno na obázcích 1-3.



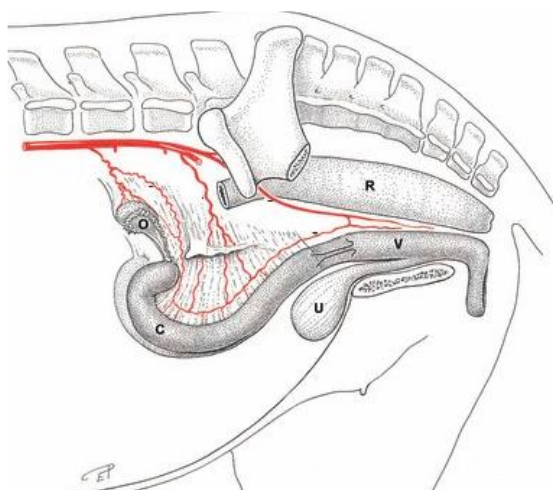
Obrázek 1: Uložení reprodukčních orgánů v těle samice skotu domácího (Kudweis, 2000)

1 močovod, 2 močový měchýř, 3 vyústění močové roury, 4 vaječník, 5 vejcovod, 6 děložní roh, 7 tělo dělohy, 8 děložní krček, 9 pochva, 10 poševní předsíň, 11 klitoris, 12 vulva



Obrázek 2: Uložení pohlavních orgánů v těle samice lamy (Llama-con.blogspot.cz, 2012)

r rektum, vu vulva, va vagina, c děložní krček, u děloha, od vejcovod, o vaječník



Obrázek 3: Uložení pohlavních orgánů v těle samice osla domácího (Renner-Martin et al., 2008)

o levý vaječník, **c** levý děložní roh, **u** močový měchýř, **v** vagina, **r** rektum

Řízení reprodukce

Pohlavní funkce jsou řízeny jak nervově, tak hormonálně. Základem celého systému je hormonální dráha hypotalamus – hypofýza – gonády. V tomto případě hypotalamus udává celé soustavě rytmus a usměrňuje aktivitu podvěsku mozkového. Hypofýza pak dané impulzy zesiluje do podoby, jakou jsou schopny gonády zachytit. Reakce pohlavních žláz na tyto podněty spouští produkci příslušného steroidního hormonu, který působí na pohlavní orgány, nervovou aktivitu i celkový metabolismus organismu. Hladiny produktů gonád i hypofýzy zpětně registruje hypotalamus, jde o tzv. zpětné vazby, a podle aktuální situace upravuje svou signalizaci směrem k hypofýze. Právě přes hypotalamus dochází k utlumení pohlavních funkcí vlivem hladovění, stresu nebo bolesti (Hafez & Hafez, 2000; Ball & Peters, 2004; Bouška et al., 2006).

Mezi hormony syntetizované v hypotalamu patří GnRH (gonadotropiny uvolňující hormon), PIF (prolactin inhibující faktor), ACTH (adrenokortikotropní hormon), oxytocin a vasopresin (Dobson et al., 2000; Reece, 2013). Po sekreci jsou však transportovány do zadního laloku hypofýzy. Zvýšení koncentrace GnRH spouští syntézu FSH (folikul stimulující hormon) a LH (luteinizační hormon) v adenohipofýze. Míra sekrece FSH a LH je určována koncentrací estrogenů a progesteronu. Vyšší hladina estrogenů způsobí vyšší sekreci gonadotropinů. Naopak progesteron tuto sekreci snižuje (Crowe et al., 1998; Reece, 2013).

FSH a LH se řadí mezi gonadotropní hormony (Hafez & Hafez, 2000; Ball & Peters, 2004). Hlavní rolí FSH je vyvolat růst a zrání folikulů, především Graafova folikulu (Mottershead, 2001; Reece 2013). Preovulační vlny LH způsobují prasknutí folikulu a následnou ovulaci. Další funkcí LH je také vytváření žlutého tělíska (*corpus luteum*) na místě prasklého folikulu (Reece, 2013).

Hormony gonád ovlivňují sexuální chování samic (Ford & D'Occhio, 1989; Mottershead, 2001; Foote, 1974). Mezi tyto hormony řadíme estrogeny (estradiol, estron, estriol), progesteron a relaxin (Anderson et al., 1982). Estrogeny jsou skupina hormonů, které se syntetizují v různých tkáních. Hlavním estrogenem produkovaným v ováriích je 17- β -estradiol. Estrogeny vznikají aromatizací androgenů komplexním procesem, který je stimulován FSH. Pokud je substrátem pro tuto aromatizaci testosteron vzniká estradiol, v případě, že je substrátem androstendion vzniká estron. Estrogeny jsou produkovány rostoucím Graafovým folikulem na vaječniku a jejich úkolem je erotizovat samici a připravují struktury samičího pohlavního ústrojí na reprodukci. Vyvolávají zrání primordiálních zárodečných buněk, podporují vývoj tkání, zajišťují ovulaci a následně vhodné prostředí pro období březosti (Murray et al., 2000; Reece, 2013). Progesteron je tvořen a secernován žlutým tělískem. Stejně jako pro ostatní steroidní, gonadální hormony, tak i pro syntézu progesteronu je nezbytný cholesterol. Gestageny, k nimž se progesteron řadí, snižují proliferační vliv estrogenů a přeměňují děložní epitel, čímž ho připravují na implantaci oplozeného vajíčka (Murray et al., 2000). Gestageny ke svému působení obvykle potřebují předchozí nebo současnou přítomnost estrogenů, neboť právě estrogeny podněcují tvorbu progesteronového receptoru. Obě skupiny hormonů, jak gestageny, tak estrogeny, působí synergicky, i když mohou být i antagonisty (Murray et al., 2000).

Hormonální řízení pohlavního cyklu

Pohlavní aktivita samic je řízena nervovou soustavou a hormonální činností hypofýzy. Řízení pohlavního cyklu se svými hormony zúčastňuje i zrající Graafův folikul a žluté tělísko. Hormon produkovaný v Graafově folikulu – estron (folikulární hormon) zapříčiní překrvení celého pohlavního ústrojí a připravuje děložní sliznici na přijetí oplozeného vajíčka. Estron vyvolává říji, proto je také někdy označován jako říjový hormon. Po prasknutí zralého Graafova folikulu dochází k poklesu sekrece estronu a nastupuje dominance progesteronu, hormonu produkovaného žlutým tělískem, které vzniklo v místě prasklého folikulu. Jeho působením dále pokračují a dokončují se přípravy sliznice dělohy na přijetí oplozeného vajíčka (Bouška et al., 2006; Reece, 2013). Dojde-li k oplození a zahníždění vajíčka (nidaci),

ustane zrání dalšího Graafova folikulu. Děloha má hlavní vliv na dobu existence žlutého tělíska. Pokud samice nezabřezla, zhruba 13. den cyklu (u domácího skotu) se z dělohy uvolňují látky ze skupiny prostaglandinů (PGF-2 alfa), které přímo působí na žluté tělísko. Luteolýza a následná regrese žlutého tělíska jsou následkem tohoto působení (Aba et al., 1995; Ball & Peters, 2004). Klesá tím sekrece progesteronu a jeho vlivu na hypotalamus a hypofýzu a přibližně 17. den cyklu (u domácího skotu) se samice dostává do nové folikulární fáze.

Pohlavní cyklus

Včasné detekování říje je klíčovým momentem pro řízení managementu reprodukce (Vanderplasseche et al., 1981; Henry et al., 1998; Ball & Peters, 2004). Zároveň rozpoznání nezabřezlých samic je důležitým faktorem především v chovu hospodářských zvířat. Toto odhalení umožňuje chovatelům dřívější pokus o novou inseminaci, snížení nákladů na výživu nebřezích samic, případně zkrácení doby stání na sucho u domácího skotu (Bouška et al., 2006). Vývoj pohlavních funkcí probíhá ve srovnání s jinými orgány později. Zároveň doba trvání pohlavní činnosti je omezená. Během období puberty vrcholí pohlavní dospívání a dochází k zvýšené produkci hormonů spojených s reprodukcí zvířat. Tato zvýšená sekrece pohlavních hormonů v pubertálním období je typická morfologickým i funkčním vývojem pohlavních orgánů, vytvářením sekundárních pohlavních znaků (pohlavní dimorfismus) nebo projevy chování dospívajících zvířat. U samic puberta vrcholí první ovulací. Nástup puberty je ovlivněn jak faktory genetickými, tak i z okolního prostředí (Ball & Peters, 2004). Pohlavní dospělost samice je podmíněna tvorbou oplození schopných pohlavních buněk při plnohodnotném reprodukčním cyklu. Za plnohodnotný cyklus je považován ten, při kterém je připraveno vajíčko k oplození a pohlavní orgány k páření a následné březosti. V období pohlavní dospělosti však ještě není dokončen tělesný vývoj. Z tohoto důvodu jsou hospodářská zvířata využívána k plemenitbě až v době tzv. chovatelské dospělosti. Díky tomu se chovatelé mohou vyvarovat nedostatečné funkčnosti hormonů, nepravidelným estrálním cyklům, zastavení tělesného růstu zvířete nebo problematických porodů.

Říjový cyklus rozdělujeme na proestrus (3 dny), estrus (1-3 dny), metestrus (2-3 dny) a diestrus (trvá do začátku proestru) (Reece, 2013). Délka cyklu se liší jak mezidruhově, tak i mezi plemeny. U domácího skotu je délka trvání cyklu asi 21 dní, s rozmezím 17-25 dní. U oslic je interval mezi ovulacemi 23-25 dní (Henry et al., 1998; McDonell, 1998). Prasknutím Graafova folikulu dochází k ovulaci. K uvolnění samičí pohlavní buňky z folikulu dochází u skotu a koňovitých v období říje, a to bez závislosti na páření. (Bouška et al., 2006). U

velbloudovitých je tzv. indukovaná ovulace, tj. uvolnění vajíčka je spuštěno pářením (Riveros et al., 2009). U primitivních plemen skotu se říje projevuje v mnohem kratším intervalu než u kulturních plemen a hlavní projev říje většinou přichází v noci. Z tohoto důvodu se u primitivních plemen skotu chovaných v zajetí těžko detekuje říje pro umělou inseminaci. Často se tedy aplikuje tzv. „fixed-time artificial insemination = FTAI“, což znamená provedení umělé inseminace bez detekce říje (Sartori & Barros, 2011).

Hormony související s březostí samic a porodem

Stav dělohy, přesněji přítomnost nebo absence plodu, po připuštění samice je rozhodující pro další hormonální změny. Pokud samice zabřezla, žluté tělísko produkující progesteron zabraňuje nástupu další folikulární fáze s dozráním folikulu a ovulací (Bouška et al., 2006). Přítomnost žlutého tělíska je nezbytně nutná téměř po celou dobu březosti u domácího skotu. Avšak dominantní produkce progesteronu pochází z placenty. U koňovitých dochází k regresi žlutého tělíska zhruba v polovině březosti a jediným zdrojem progesteronu se tak stává placenta. Největším specifikem březosti koňovitých je tvorba endometriálních pohárků zhruba okolo 35. dne březosti (u klisen). Z těchto pohárků je secernován hormon známý jako gonadotropin séra březích klisen (PMSG) (Boeta & Zarco, 2005). Funkce tohoto hormonu spočívá v napomáhání tvorbě nových folikulů, které následně ovulují a vytváří tak další žlutá tělíska. Tímto procesem je zajištěna dostatečná produkce progesteronu ze žlutého tělíska. Všechna tato žlutá tělíska zanikají okolo 150. dne březosti (u klisen) (Kindahl et al., 1982; Murphy & Martinuk, 1991; Hoppen, 1994; Reece, 2013).

Funkce progesteronu je spojena s udržení březosti, stimulací vývoje alveolů mléčné žlázy a bránění děložním stahům v průběhu březosti (Raggi et al., 1999; Reece, 2013). Zvýšená hladina progesteronu je u domácího skotu téměř po celou dobu březosti a klesá zhruba deset dní před porodem (Cole & Cupps, 1969). Koncentrace progesteronu u klisen postupně stoupá s pokračující březostí. Pokles hladiny progesteronu u klisen byl zaznamenán mezi 110. a 160. dnem březosti (Meira et al., 1998; Hoffmann et al., 2014). U velbloudovitých se koncentrace progesteronu rapidně zvyšuje během prvního měsíce březosti a výrazně klesá dva až tři dny před porodem. U velbloudů je maximální koncentrace progesteronu v polovině březosti. U lam bylo zaznamenáno postupné zvyšování úrovně progesteronu v období od ovulace během březosti (Riveros et al., 2009). A významný nárůst progesteronu u lam byl zaznamenán od 30. dne březosti do konce druhého měsíce březosti (Raggi et al., 1999). V posledních 4 týdnech březosti lam byl patrný pokles hladiny

progesteronu s výrazným snížením 24 hodin před porodem (Leon et al., 1990; Riveros et al., 2009).

Koncentrace estrogenů je v během březosti nižší než hladina progesteronu. Okolo 200. dne březosti (u domácího skotu) se úroveň estrogenu mírně zvyšuje a dosáhne maxima v průběhu několika dní před porodem (Desaulniers et al., 1989; Hafez & Hafez, 2000; Shah et al. 2006). Koncentrace estradiolu během březosti klisen je stabilnější než koncentrace progesteronu. Hladina estronu u oslic rapidně stoupá zhruba uprostřed březosti a začne klesat během posledních dvou týdnů před porodem (Hoffmann et al., 2014). Koncentrace estradiolu stoupá až do 165. dne březosti, poté začne klesat. Nejnižší koncentrace dosáhne estradiol zhruba 20 dní před porodem (Meira et al., 1998; Hoffmann et al., 2014). U lam se hladina estradiolu-17 β v plazmě zvyšuje okolo osmého měsíce březosti a maxima dosahuje během posledních dvou měsíců březosti. Bazální úroveň dosáhne estradiol-17 β dva dny před porodem. Nárůst koncentrace estronu je pozorovatelný v 11. měsíci březosti (Riveros et al., 2009).

Oxytocin, také produkovan žlutým tělískem, ovlivňuje kontrakce během porodu. Následné sání mléka mláďaty zvyšuje hladinu oxytocinu i jeho cirkulaci a tím se také zvyšuje sekrece PGF -2 alfa, který způsobuje luteolýzu a spuštění nového reprodukčního cyklu (Hafez & Hafez, 2000).

Porod

Porod je fyziologický proces, při kterém je březost ukončena vypuzením plodu. Délka březosti se liší jak mezidruhově, tak i mezi plemeny. Trvání gestace jednotlivých druhů zvířat se zaměřením na domácí skot, velbloudy, lamy a oslice jsou zobrazeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Délka březosti se zaměřením na domácí skot, velbloudy, lamy a oslice

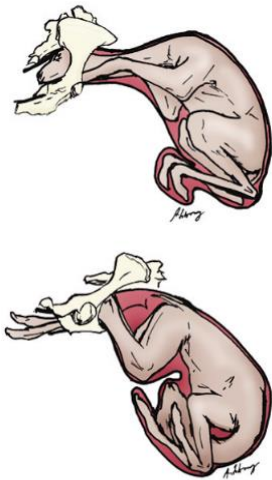
Domácí skot	285-290 dní
Velbloudi	355-419 dní
Lamy	327-357 dní
Oslice	339-375 dní

(Hafez & Hafez, 2000; Ball & Peters, 2004; Hagstrom, 2004; Fowler, 2011; Crisci et al., 2014)

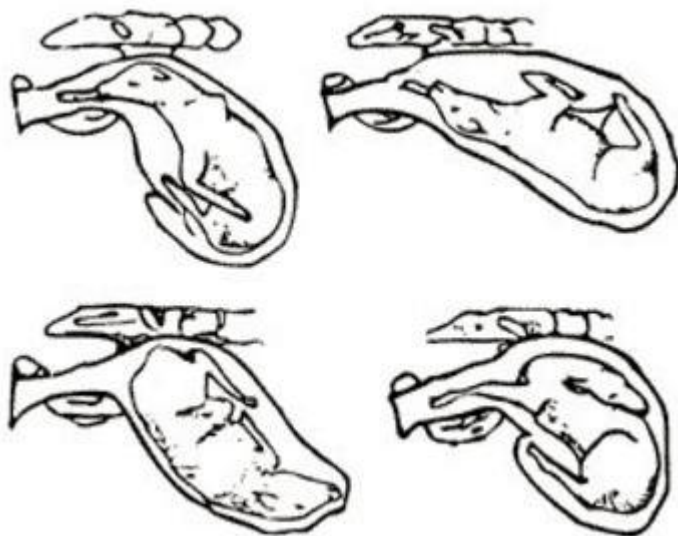
Mezi příznaky blížícího se porodu patří otok vulvy, vytékající mukózní sekret, uvolnění břišních svalů s následných poklesem břicha, neklid, časté ulehání a vstávání, větší

frekvence močení, samice se ohlíží na břišní partie nebo odkapávání mléčiva z mléčné žlázy (AAA, 2008; Reece, 2013).

Období porodu se dělí na tři fáze: První, otevírací je doprovázena kontrakcemi dělohy, rozvíráním děložního krčku vlivem hormonů a tlaku plodu, který zaujímá porodní polohu a je tlačěn do porodních cest. Pravidelné polohy fetu jsou vyobrazeny na obrázku 4, v tomto případě se jedná o plod lamy. Na obrázku 5 jsou pak abnormální polohy plodu, tentokrát na příkladu domácího skotu. První fáze je ukončena prasknutím plodových obalů. Ve druhém stádiu dochází k vypuzení plodu důsledkem velmi silných kontrakcí. V třetí, poporodní fázi, slábnou kontrakce a z těla samice jsou vyloučeny lochie (Ball & Peters, 2004).



Obrázek 4: Poloha podélná přední (nahore), poloha podélná zadní (dole) (Rodriguez et al.. 2014)



Obrázek 5: Abnormální pozice plodu (Whittier & Thorne, 2015)

Období puerperia

V období puerperia se samičí organismus vyrovnává s rozsáhlými regresivními změnami vzniklými březostí a porodem. V období puerperia se vrací děloha do stavu před březostí, obnovuje se cyklická činnost ovárií a nastupuje období laktace (Reece, 2013). U domácího skotu rozdělujeme postpartální období na dvě fáze: 1. rané – kontrakce dělohy ustupují, kratší trvajících stahy umožňují vypuzování lochií, dochází k involuci dělohy, kdy děloha postupně dosahuje velikosti před březostí. Při normálním porodu je tato fáze ukončena za 3-8 hodin. Nevypuzené zbytky plodových obalů mohou být zdrojem infekcí a příčinou chronických zánětů dělohy. Dále 2. fáze – pozdní – menší rozsah změn na děloze, obnovení ovariálního cyklu u polyestrických zvířat. Velikost dělohy se vrací do původního stavu asi za 3 týdny (Hafez & Hafez, 2000; Noakes et al., 2001; Reece, 2013). U klisen probíhá involuce dělohy velmi rychle, ale nestačí se dokončit do první poporodní říje (Reece, 2013). U alpak se děloha vrací do normálního stavu kolem 15. dne postpartálního období (Pearson et al., 2014).

K regeneraci endometria u domácího skotu dochází kolem 42. dne. Starší krávy potřebují k regeneraci delší dobu. Mezi fyziologické změny v puerperiu patří zpomalení a prohloubení dechu, zmenšování objemu břišní dutiny, zvýšení žravosti zvířete, vzrůstající nároky samice na výživnou a energetickou hodnotu krmiv, zvětšení mléčné žlázy a projevy mateřského pudu (Burdych et al., 2004).

Špatná energetická bilance může negativně působit na počet rostoucích folikulů, růst a dozrávání dominantního folikulu, zpoždění první poporodní ovulace, zpoždění nástupu říje (Peter et al., 2009).

Během poporodního období také dochází k hormonálním změnám. Zaniká žluté tělíčko a oslabuje se vliv progesteronu. U skotu domácího přibližně 2-3 dny po porodu nastává přechodné zvýšení koncentrace FSH, což vede k obnovení folikulárních vln a následnému růstu folikulů. Okolo desátého dne po otelení se objevuje první dominantní folikul. K ovulaci dominantního folikulu v období puerperia dochází při dostatečné koncentraci LH (Savio et al., 1990; Noakes et al., 2001). Vlček (1982) uvádí, že růst folikulů je u některých zvířat už mezi 15. - 17. dnem po porodu, častěji však okolo 18. - 20. dne. Třetí až čtvrtý týden jsou samice ve folikulární fázi a některé dokonce ovulují. U velbloudovitých se v prvním týdnu po porodu mírně zvyšuje koncentrace estradiolu-17 β a folikulární aktivita se obnovuje mezi 4. a 6. dnem po porodu. Pokud došlo k páření, ovulace může nastat už druhý týden puerperia (Löfstedt, 2004; Riveros et al., 2009; Riveros et al., 2015). U klisen se první estrus objevuje mezi 5. až 11. dnem poporodního období, u oslic spíše kolem 10. dne (Loy, 1980; Tosi et al., 2013). Délku intervalu mezi porodem a první ovulací u skotu

domácího může ovlivnit několik faktorů, například tělesná kondice, plemeno, zatížení při porodu, úroveň výživy nebo frekvence a délka dojení. Obecně platí zásada, že se plemence inseminují až po šesti týdnech po porodu, tedy v průběhu druhé říje. První poporodní říje bývá neplnohodnotná a první ovulace může proběhnout bez příznaků (Beam & Butler, 1997; Burdych et al., 2004).

Diagnostické metody související s reprodukcí

Diagnostika říje

Říje je souborem všech změn na pohlavním ústrojí za současného zintenzivnění pohlavního pudu, které jsou k páření a oplození vajíčka nezbytným předpokladem. Během tohoto období dochází ke změnám v chování jejichž detekování slouží jako vizuální diagnostika nastupujícího estru. U skotu patří mezi projevy blížící se říje zejména: neklid zvířete, vzájemné očichávání, olizování, hlasové projevy, snížený zájem o krmivo naopak zvýšený o okolní prostředí. Výrazným znakem říjového chování je naskakování na jiné plemence, v tomto případě platí, že samice, která stojí a nechá na sebe naskakovat je již v říji, zatímco samice, která naskakuje, teprve do říje půjde. Dalšími příznaky blížící se říje jsou změny na pohlavním ústrojí, mezi které patří otoky vulvy (výrazné prokrvení, zvětšení a zarudnutí) a výtok průhledného, vazkého cervikálního hlenu (Bouška et al., 2006). U velbloudovitých se samice v říji separují od stáda, rozprašují moč pomocí ocasu a je patrný otok vulvy (FAO, 2017). Změny v chování oslic důsledkem blížícího se estru jsou především natahování krku vpřed se skláněním hlavy, otevírání a zavírání tlamy s uvolněnými pysky a vydáváním typického zvuku, sklápění uší vzad na krk, odtahování ocasu s odhalováním peritonea směrem k samci (Clayton et al., 1981; Vandeplassche et al., 1981; Henry et al., 1991). Pokud se ve stádě objeví více oslic v říji, vytvářejí si odděleně od ostatních zvířat tzv. sexuálně aktivní skupinu. Tento jev byl popsán i u domácích skotu (Henry et al., 1991).

K vyhledání samic v říji je možné využít i androgenizované samice nebo vasektomované samce, kteří ji bezpečně odhalí, u níž můžeme zpozorovat reflex nehybnosti (Ball & Peters, 2004).

Dalším příznakem je měnící se tělesná teplota v důsledku nastupujícího estru, kdy 2-3 dny před říjí dochází k poklesu teploty a následnému rychlému vzrůstu. Dále dochází ke změnám ve vodivosti tkání pochvy (Smith et al., 1989; Ball & Peters, 2004; PennState Extension, 2017). Murray et al. (2000) popisuje vliv gestagenů na snížení periferního průtoku

krve. Tím dochází ke snižování tepelných ztrát. Tělesná teplota má tedy tendence se zvyšovat během luteální fáze a toho lze využít jako indikátoru ovulace.

Vlivem zvýšené hladiny estrogenů v krvi během říje se vytvářejí v některých tělních tekutinách krystalické útvary. Tyto krystaly je možné mikroskopicky monitorovat po zaschnutí tekutiny na podložním sklíčku. V cervikálním hlenu je možné v období říje pozorovat krystaly, které připomínají list kapradiny (Cortés et al., 2014). Fenoménu krystalizace je detailněji věnována kapitola Neinvazivní diagnostika březosti, diagnostika ze slin.

Zvýšená pohybová aktivita samic v říji se monitoruje pomocí pedometrů nebo aktivometrů (Maatje et al., 1996; Rorie et al., 2002). Zároveň je možné využít tzv. detektory naskakování, které spočívají v barevném označení říjící se plemence. Ampule s barevnou náplní se umísťují v oblasti kořene ocasu zvířat, u kterých se předpokládá období říje. Tlakem hrudní části naskakující samice dojde k uvolnění barviva z trubičky a následnému označení plemence v říji, která na sebe nechá naskakovat (Ball & Peters, 2004; PennState Extension, 2017).

Diagnostika březosti

Existuje několik způsobů, jak roztřídit metody diagnostikující březost samic. Podle přístupu ke zvířeti můžeme diagnostické techniky označit jako invazivní nebo neinvazivní (Kumar et al., 2013). Purohit (2010) zmiňuje rozdělení do dvou skupin, a to na přímé (s využitím klinického vyšetření zvířete) a nepřímé (pomocí laboratorního vyhodnocení tělních tekutin či tkání) nebo do tří skupin na vizuální, klinické a laboratorní. Dle Noakese et al. (2001) jsou tři skupiny diagnostických metod, a to klinické, ultrasonografické a laboratorní. Na základě studie autorů Wani et al. (2003) uvádí Krishna Rao a Veena (2009) a Rao Krishna a Veena (2009) rozdělení způsobů diagnostiky březosti na fyzické, chemické, biochemické, imunologické a biologické. Cowie (1948) ještě dodává vyšetřovací metody na bázi hormonální a enzymatické.

Invazivní diagnostika březosti

Invazivní detekce březosti je obvykle finančně nákladná, vyžaduje přítomnost veterináře nebo jiného odborníka, spolupráci zvířat nebo dokonce jejich sedací. V zájmových chovech se invazivní detekce březosti téměř neprovádí, ve většině případů záleží na

subjektivním posouzení chovatele, který si všímá fyziologických změn na samicích (Purohit, 2010; Dehnhard et al., 2015).

Nejčastěji používanou invazivní metodou je vyšetření per rectum. Hlavním principem této metody je prohmatání dělohy, při němž je možné posoudit např. velikost, uložení a hmotnost dělohy, konzistenci děložní stěny, asymetrii děložních rohů případně tloušťku a pulzaci střední děložní cévy u březích samic. Dále pak palpaci fluktuace plodových obalů, placentomů nebo samotného plodu (Noakes et al., 2001). Sonografické vyšetření se provádí zavedením ruky se sondou do rekta. Dle obrazů na monitoru ze skenování děložních rohů společně s vaječníky lze spolehlivě určit, zda je samice březí či nikoli (Noakes et al., 2001; Purohit, 2010). Rektální palpaci společně s transrektální sonografií se u velbloudích a lamích samic provádí ve stoje nebo vsedě (obrázek 6 a 7). Využitím palpaci lze březost velbloudích samic diagnostikovat od 60. dne po připuštění nebo inseminaci, sonograficky již od 17. – 20. dne (Skidmore, 2000; Vyas et al., 2002). Kromě rektální palpaci můžeme mezi invazivní metody zařadit také analýzy reprodukčních hormonů v krevním séru a v krevní plazmě pomocí radioimunoanalýzy (RIA) a enzymové imunoanalýzy (EIA) (Hodges et al., 2010). Pro získání vzorku krve je nezbytné narušit kůži zvířete (Garshelis, 2006; Kumar et al., 2013). V současné době jsou dostupné testovací kity, které lze použít bez předchozí úpravy krevního vzorku např. extrakcí steroidních hormonů z matrixu (Hodges et al., 2010). Koncentrace steroidních hormonů byla již stanovována v plazmě několika druhů zvířat jako např. domácího skotu (Shah et al., 2006), skotu Zebu (*Bos indicus*) (Gradela et al., 1996), velblouda jednohrbého (*Camelus dromedarius*) (Skidmore et al., 1996), lamy krotké (*Lama glama*) (Bravo et al., 1990) nebo lamy alpaky (*Vicugna pacos*) (Bravo et al., 1992).



Obrázek 6: transrektální sonografie u samice lamy alpaky (*Vicugna Pacos*) (Camelid Veterinary Service Ltd, 2017)



Obrázek 7: Transrektální sonografie u samice velblouda jednohrbého (*Camelus dromedarius*) (Camel Reproduction Centre Dubai, UAE, 2017)

Neinvazivní diagnostika březosti

Neinvazivní diagnostika březosti z moči

Test klíčivosti semen v zředěné moči, též známý jako Punyakotiho test, byl poprvé popsán v souvislosti s detekcí těhotenství žen již ve starém Egyptě (Veena & Narendranath, 2003). Je zajímavé, že výsledky studií zaměřených na diagnostiku březosti zvířat se výrazně liší od výsledků pocházejících se starého Egypta, kde právě moč netěhotných žen inhibovala klíčení semen pšenice (Veena & Narendranath, 2003; Narayana Swamy et al., 2010; Juodžentytė & Žilaitis, 2016). Ghalioungui et al. (1963) dokonce uvádí využití pozorovatelné lepší klíčivosti jednoho ze dvou druhů obilovin, pšenice (*Triticum*) variety *baladi, hindi* a ječmen (*Hordeum*) k určení pohlaví plodu.

Přesná příčina inhibované klíčivosti semen v zředěné moči březích samic zatím nebyla identifikována (Veena & Narendranath, 1993). Avšak právě moč březích samic obsahuje kromě běžných substancí jako je močovina a kyselina močová, také fytohormon, konkrétně kyselinu abscisovou (ABA). Tato látka zajišťuje v přírodě dormanci semen. Vyšší hladina ABA byla potvrzena v moči březích samic oproti nebřezím (170,62 nmol/ml vs. 74,46 nmol/ml). Existuje tedy domněnka, že právě ABA by mohla být jedním z činitelů potlačujících, jak počet vyklíčených semen v zředěné moči, tak i délku klíčků (Veena Ganesaiah, 2006). Jako další faktor s možným vlivem na klíčivost semen bylo považováno pH moči (Veena & Narendranath, 1993) a také hormony spojené s reprodukcí samic (Nirmala et al., 2008). Avšak v obou případech jejich inhibující efekt nebyl prokázán.

Principem testu klíčivosti je porovnání počtu vyklíčených semen, případně délek jejich klíčků, v roztoku zředěné moči (moč : destilovaná voda) březích a nebřezích samic (Veena Ganesaiah, 2006). Test klíčivosti lze provést hned několika způsoby. Veena a Narendranath (1993) nechali semena klíčit v zředěné moči o koncentraci 1:4. Na patnáct semen v jedné Petriho misce pak připadalo 5 ml tohoto roztoku. Počet vyklíčených semen byl vyhodnocen po dvou dnech a délka klíčku byla změřena až po pěti dnech. Rao Krishna a Veena (2009) použili stejné schéma experimentu jako Veena a Narendranath (1993), navíc však zahrnuli sledování změn zbarvení semen nebo samotného roztoku dva dny po začátku testu. Dilrukshi a Perera (2009) nechali klíčit 25 semen na 15 ml roztoku s využitím třech ředění: 1:4, 1:10 a 1:14. Vyklíčená semena byla spočítána za dva dny a délky klíčků se měřily ve 24 hodinovém intervalu po dobu dvou dní. Ve studii od Narayana Swamy et al. (2010) připadalo na 15 semen 15 ml roztoku zředěné moči o koncentraci 1:4 a test byl vyhodnocen za tři dny. Perumal et al. (2014) ve své studii využili ke klíčení filtrační papír, na který aplikovali roztok

(moč : destilovaná voda) v ředění 1:4. Petriho misky byly během celého jejich experimentu zakryté, aby se zabránilo vypařování roztoku.

Dilrukshi a Perera (2009), Narayana Swamy et al. (2010), Rine et al. (2014) nebo Juodžentytė a Žilaitis (2016) porovnali výsledky klíčivosti v zředěné moči s kontrolními variantami, které obsahovaly pouze destilovanou vodu.

Již několik druhů semen bylo použito pro otestování této diagnostické metody, například fazole mungo (*Vigna radiata*) (Dilrukshi & Perera, 2009), pšenice (*Triticum*) (Rao Krishna & Veena, 2009) nebo kukuřice (*Zea*) (Hussain et al., 2016). Uplatnění testu klíčivosti semen k diagnostice březosti bylo zkoumáno u několika živočišných druhů, například u skotu Malnad Gidda (Narayana Swamy et al., 2010), mithun (*Bos frontalis*) (Perumal, 2014), ovcí a koz (Islam et al., 2014) nebo lam alpak (*Vicugna pacos*) (Kubátová & Fedorova, 2016).

Mnoho autorů považuje test klíčivosti semen v zředěné moči za jednoduchou a spolehlivou metodu detekce březosti u skotu (Dilrukshi & Perera, 2009; Nirmala et al., 2008; Narayana Swamy et al., 2010). Rao Krishna a Veena (2009) odebírali moč od krav 14, 21, 28, 35 a 45 dní po inseminaci. Podle jejich výsledků lze nejlépe stanovit březost pomocí testu klíčivosti semen mezi 28. a 35. dnem po inseminaci. Stejně výsledky publikoval i Rine et al. (2014).

Mezi nejvíce známé diagnostické metody využívající moč patří Cuboniho reakce, která byla objevena Cubonim v roce 1934 pro detekci březosti klisen. Tato technika spočívá v reakci estrogenů v moči s přidanou kyselinou sírovou (England, 2008) a principem je vytvoření barevné opalescence, která indikuje březost klisen. Ve vzorcích nebřezích samic se neobjevuje fluorescence a vytváří se spíše hnědé zbarvení (Purohit, 2010).

Přesnost 90 % se uvádí po 100. dnu březosti a 100 % po 150. dnu březosti u klisen (Purohit, 2010). Hayes (2002) publikoval použitelnost testu již okolo 120. dne březosti u klisen. Fedorova et al. (2015) uvádí 100% spolehlivost testu s chloridem barnatým ve třetí třetině březosti samic velblouda dvouhrbého. Cuboniho reakce byla dále testována u skotu v pozdější fázi březosti (Von Locvančič, 1969).

Stanovení hormonů v moči lze provést pomocí radioimunoanalýzy a enzymové imunoanalýzy (Hodges et al., 2010). Principem RIA, též nazývané radioimunologické stanovení, je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou. RIA umožňuje přesné stanovení koncentrace různých látek v tělních tekutinách. Tato metoda je prováděna za přítomnosti vhodné radioaktivní sloučeniny, označené jako radioindikátor (Abraham, 1975; Brooks et al., 1975; Jaffe & Behrman, 1979). V kvantifikačním stanovení bez použití radioizotopů a zařízení pro měření radioaktivního záření spočívá metoda EIA, což je její

nesporná výhoda oproti RIA (Noakes et al., 2001; Domènech et al., 2011). Enzymová imunoanalýza využívá enzymů ke značení antigenu nebo protilátky (Porstmann & Kiessig, 1992). EIA metody dělíme na kompetitivní a nekompetitivní (sendvičové) (Engvall, 1980). Pro stanovení reprodukčních hormonů v moči byla EIA použita u několika živočišných druhů: skot domácí (Yang et al., 2003), bizon americký (*Bison bison*) (Kirkpatrick et al., 1991), lama alpaka (*Vicugna pacos*) (Volkery et al., 2012), slon africký (*Loxodonta africana*) (Heistermann et al., 1997), nosorožec (*Ceratotherium simum a Diceros bicornis*) (Hindle et al., 1992).

Test s chloridem barnatým byl poprvé popsán v roce 1965 a primárně určen pro skot (Maslov & Smirnov, 1965). Princip je založen na přidání 1% roztoku chloridu barnatého ($BaCl_2$) do čerstvě odebrané moči. Pokud samice není březí, tvoří se v roztoku bílé sraženiny (Rao Krishna & Veena, 2009). U zabřezlých samic zůstává roztok čistý (Lalrintluanga & Dutta, 2009). Zatím není přesně známo, co způsobuje takto odlišnou reakci mezi březími a nebřezími samicemi (Ndu et al., 2000a; Ndu et al., 2000b; Lalrintluanga & Dutta, 2009). Pouze se předpokládá, že vyšší koncentrace progesteronu během březosti zabraňuje tvorbě sraženiny (Maslov & Smirnov, 1965; Lalrintluanga & Dutta, 2009).

Spolehlivost této metody byla potvrzena několika autory (Ndu et al., 2000a; Ndu et al., 2000b; Krishna Rao & Veena, 2009). U březích prasnic se spolehlivost metody lišila podle stádia březosti následujícím způsobem: u březích méně než 38 dní byl test spolehlivý ze 64 %, u březích mezi 38. a 76. dnem ze 68 % a u březích více než 76 dní až z 84 % (Lalrintluanga & Dutta, 2009). Ve studii Ndu et al. (2000a; 2000b) byla přesnost testu 95 % u prasnic, které byly březí více než 39 dní. U krav tento test ukázal mnoho chyb, zvláště v případě určení nezabřezlých samic (Krishna Rao & Veena, 2009). Banerjee (1974) zmiňuje 85% úspěšnost testu s chloridem barnatým mezi 50. a 90. dnem březosti u dromedárů (*Camelus dromedarius*) (Purohit, 2010).

Existuje několik variant, jak provést test s chloridem barnatým. Lalrintluanga a Dutta (2009) přidali 5 ml 1% roztoku $BaCl_2$ do 5 ml čerstvě odebrané moči. Krishna Rao a Veena (2009) připouští, že je možné použít i jiné množství, ale poměr moče a chloridu barnatého by měl být zachován. Ndu et al. (2000b) přidávali pět kapek 1% $BaCl_2$ přibližně do 2 ml moči, promíchali a celý roztok nechali pět minut odstát, poté vyhodnotili výsledky. Ohazurike (1990) potvrdil využitelnost tohoto testu u ovcí a koz s využitím 2% $BaCl_2$.

Test s kyselinou fenolsulfonovou využívá éterovou extrakci estrogenů v moči. Pomocí hydrolýzy se oddělí močové pigmenty a po odpaření éteru se smíchají s činidlem kyseliny fenolsulfonové. Mayer (1944) uvádí, že výsledkem je pak růžové až červené zbarvení moči

březích klisen (Purohit, 2010). Mezi 120. a 150. dnem březosti test vykazuje přesnost 70-80 % (Purohit, 2010).

Principem Koberovy metody je kolorimetrické vyhodnocení estronu v moči klisen. Postup spočívá se smíchání moči s koncentrovanou kyselinou sírovou nebo fenolsulfonovou. Výsledkem testu je zbarvení roztoku po zahřátí (Kober, 1938).

Modifikací Koberovy metody je tzv. Lunaasova metoda určená pro diagnostiku březosti prasat. Principem je detekce estrogenů v moči na základě přítomnosti červeného, a nakonec zeleného zbarvení (Lunaas, 1961). U prasat je tato metoda spolehlivá z 90,3 % (Cupps et al., 1966). V případě klisen (Cox & Galina, 1970) a domácího skotu (Von Locvančič, 1969) se využití této techniky k diagnostice březosti neosvědčilo.

Diagnostika ze slin

Přestože odběr slin probíhá přímo z tlamy zvířete, je tato metoda mnoha autory považována za neinvazivní (Haberová et al., 2012; Skalova et al., 2013). Sliny lze získat výtěrem z tlamy pomocí plastového kávového míchátko (Skalova et al., 2013) nebo plastové lžice (Fedorova et al., 2015). Vzorky slin je možné také odebrat otiskem zmraženého podložního sklíčka na jazyk zvířete (Pardo-Carmona et al., 2010) nebo pomocí speciálních kitů (Volkery et al., 2012).

Fenomén krystalizace byl poprvé popsán v roce 1946 v ženském cervikálním hlenu (Papanicolau, 1946; Zondek & Rozin, 1954). Tento jev je také znám jako arborizace (Zondek & Cooper, 1954) nebo kaprad'ovitě útvary (Pensyl & Dillehay, 1998). Zondek (1959) uvádí, že krystalizace vzniká v roztocích bílkovin a sacharidů. Zondek (1959) dále zmiňuje, že krystaly jsou až z 97 % tvořeny z chloridu sodného (NaCl). K tvorbě krystalických útvarů je nutná přítomnost sodíkových (Na) a draslíkových (K) iontů. Jádra krystalů tvoří proteinové molekuly, které vážou molekuly vody (H₂O) se solemi (Na a K). Soli vytvářejí krystalky v proteinových molekulách, a tak vznikají útvary známé jako krystalizace tělních tekutin (Cortés et al., 2014).

Vyšetření cervikálního hlenu hraje významnou roli v prevenci reprodukčních poruch (Ball & Peters, 2004). Během estru je charakter tohoto hlenu jedním z hlavních ukazatelů právě probíhající říje (Bouška et al., 2006). Papanicolau (1946) poprvé popsal možný vztah mezi krystalizací v cervikálním hlenu, cirkulací estrogenů a vazkostí hlenu (Zondek, 1959). Souvislost mezi mírou krystalizace v cervikálním hlenu a hodnotami reprodukčních hormonů v krvi popsali i Ahmadi et al. (2005). V období zvýšených koncentrací estrogenů v krvi, během proestru a říje, dochází v některých tělních tekutinách k tvorbě krystalů. Linford

(1974) popsal nejvíce rozvinutou krystalizaci během vyšší hladiny estrogenů, naopak při dominanci progesteronu byla úroveň krystalizace minimální.

Kromě cervikálního hlenu byl jev arborizace pozorována v nasálním hlenu (Peterson, 1984), folikulární tekutině a mozkomíšním moku (Zondek, 1959), slzách (Rolando, 1988; Norn, 1988) nebo ve slinách (Guida et al., 1993). Krystalizace byla též popsána u zvířat, a to hned v několika tělních tekutinách: v cervikálním a vaginálním hlenu (Alliston et al., 1958; Noonan et al., 1975), nasálním hlenu (Tsuimira et al., 1960), spermatu a kolostru (Zondek & Rozin, 1954) nebo ve slinách (Haberová, 2010; Pardo-Carmona et al., 2010; Skalova et al., 2013).

Existuje několik způsobů, jak vyhodnotit krystalizaci ve slinách a klasifikace jednotlivých krystalů se liší mezi autory (Haberová, 2010; Pardo-Carmona et al., 2010; Skalova et al., 2013). Zatímco Pardo-Carmona et al. (2010) popisoval arborizaci pouze třemi stupni, Haberová (2010) uvádí sedm úrovní, podle kterých lze popsat výskyt krystalizace ve slinách. Skalova et al. (2013) hodnotili i atypickou krystalizaci ve slinách domácího skotu.

K monitoringu reprodukce pomocí slin lze kromě krystalizace využít hormonální analýzy (Czekala & Callison, 1996; Volkery et al., 2012; Fedorova et al., 2015). Mezi reprodukční hormony, které byly stanovovány ve slinách patří např. progesteron (Sathe, 2012; Fedorova et al., 2015), estron sulfát (E_1S) (Sist et al., 1988; Othaki et al., 1997; Volkery et al., 2012), estradiol (Fedorova et al., 2015) nebo pregnandiol-3-glukuronid (PdG) (Volkery et al., 2012).

Další neinvazivní diagnostické metody

Zevní diagnostika je významná převážně v chovu polyestrických zvířat. Takto prováděná detekce březosti se zaměřuje na přítomnost plodu pohledem (pohyby na pravé straně břišní dutiny po 6. měsíci březosti domácího skotu a klisen), pohmatem (balotáží fetu) a odposlechem pomocí stetoskopu (auskultací). Při balotáži se sevřenou pěstí nebo rozevřenou dlaní tlačí opakovaně na břišní stěnu na pravé straně břicha před předkolení řasou. Dochází k rozhoupání dělohy, která je volně zavěšena na pohyblivých pánevních vazech. Poslech srdečních ozev plodu je u domácího skotu a klisen možný až po sedmém měsíci březosti, v oblasti nad předkolení řasou (Noakes et al., 2001; Purohit, 2010). Mezi vizuální metody můžeme také zařadit odhalení nezabřezlých samic sledováním návratnosti říje (Phillips, 2010; Purohit, 2010). U primipar lze dobře pozorovat výrazné zvětšování mléčné žlázy. V období stání na sucho je toto zvětšení viditelné během posledních čtrnácti dní před porodem (Noakes et al., 2001).

Transabdominální ultrasonografie je moderní diagnostická metoda využívající vysokofrekvenční zvukové vlny. Pomocí této techniky je možné bezbolestně a bez zvláštních fixačních procesů nahlédnout do nitra zvířete (Kähn, 1992; Noakes et al., 2001). Transabdominální ultrasonografie lze využít k vyšetření reprodukční soustavy např. domácího skotu (Heyman et al., 2002), koní (Baska-Vincze et al., 2014), ovcí (Buckrell et al., 1986), koz (Medan et al., 2004), prasat (Knox & Althouse, 1999), lam nebo alpák (obrázek 8) (Cebra et al., 2002).



Obrázek 8: Transabdominální sonografie u lamy alpaky (Camelid Veterinary Services Ltd, 2017)

Analýzu hormonů spojených s reprodukcí lze také provést z trusu (Kumar et al., 2013) nebo mléka (Volkery et al., 2012; Noakes et al., 2001) pomocí imunoanalytických metod (Hodges et al., 2010). Fekální steroidní hormony byly stanovovány např. u domácího skotu a pižmoně severního (*Ovibos moschatus*) (Desaulniers et al., 1989), bizona amerického (*Bison bison*), klisen (Amer et al., 2008), nosorožců černých (*Diceros bicornis*) (Schwarzenberger et al., 1996) nebo prasnic (Xue et al., 2017). Analýza mléka na reprodukční hormony byla provedena např. u skotu domácího (Bulman & Lamming, 1978; Gaiani et al., 1982) nebo lam alpák (Volkery et al., 2012), klisen (Gunther et al., 1980). Stanovení steroidních hormonů je proveditelné i ze srsti domácího skotu (Gleixner & Meyer, 1997).

Koagulace mléka po přidání alkoholu také indikuje březost samic. Koagulace se projeví 1-3 hodiny po smíchání mléka s alkoholem (Purohit, 2010). Další koagulace mléka

březích samic vzniká, když se do 1 ml mléka přidá několik kapek 3% roztoku síranu měďnatého (Temblador & Acosta, 1971; Krishna Rao & Veena, 2009). Kavani (1976) uvádí přesnost této metody kolem 52-64 %, připouští však možné ovlivnění chybou chovatele nebo nemocemi vemene (Purohit, 2010). Krishna Rao a Veena (2009) publikovali 90 % pozitivních výsledků v mléce březích samic.

Další metodou, jak lze stanovit březost zvířete je smíchání a následné pováření cervikálního hlenu společně s 10-15 % NaOH (Williams, 1964). U březích zvířat se roztok zbarví do tmavě žluté až oranžové (Purohit, 2010).

Kosjakovův test je založen na přítomnosti síry v srsti zvířat (Cowie, 1948). U březích samic je obsah síry v srsti nižší než u nebřezích zvířat. Srst testovaných zvířat je namočena do 10% hydroxidu draselného a vařena s 2 ml destilované vody. Postupně se přidá 1% methylenová modř a několik kapek 4% kyseliny chlorovodíkové. U březích samic se modré zabarvení roztoku vytratí (Purohit, 2010).

5 Materiál a metodika

Presentovaná disertační práce se řídila doporučenými principy na Fakultě tropického zemědělství při České zemědělské univerzitě v Praze (FTZ ČZU v Praze) (Metodický manuál pro psaní DP, 2016) a pravidly citování FTZ ČZU v Praze (Pravidla citování na Fakultě tropického zemědělství ČZU v Praze pro psaní textů v češtině, 2014).

5.1 Odběr vzorků

5.1.1 Diagnostika březosti z moči skotu

Vzorky moči byly odebírány manuálně během spontánního močení do půllitrových plastových kelímků, které byly uchyceny na teleskopické tyči (Obrázek 9 a 10) (Rao Krishna & Veena, 2009; Haberová et al., 2012). Během odběrů vzorků moči nedocházelo k fyzickému kontaktu se zvířaty.



Obrázek 9: Odběr moči jalovic vleže, foto: Autorka



Obrázek 10: Odběr moči jalovic ve stoje, foto: Autorka

Jalovice českého strakatého skotu zařazené do výzkumu byly ze zemědělského družstva Vendolí (okres Svitavy). Všechny jalovice byly bez reprodukčních nebo jiných zdravotních poruch. Jalovice byly krmeny směsnou krmnou dávkou složenou z jetelové senáže, kukuřičné siláže, slámy, šrotu a minerální směs pro jalovice. Březí jalovice byly uměle inseminovány a březost byla potvrzena veterinářem pomocí sonografie nejdříve 28. den po umělé inseminaci. Odběr vzorků započal vždy po ranním krmení, nejpozději okolo 7:00. Všechny odběry byly uskutečněny autorkou práce.

První fáze výzkumu

Do první fáze výzkumu bylo zařazeno 20 březích a 20 nebřezích jalovic českého strakatého skotu. Odběry vzorků moči probíhaly od dubna do listopadu 2013. Vzorky moči březích jalovic byly nejprve odebírány ve dvoutýdenním intervalu do 147. dne jejich březosti. V pozdější fázi březosti byl interval mezi odběry prodloužen na 6 týdnů. Kontrolní odběry vzorků moči nebřezích jalovic probíhaly ve stejných termínech, jako odběry moči březích jalovic.

Druhá fáze výzkumu

Vzorky moči dvanácti březích jalovic byly odebírány od června do prosince 2014. Vzorky byly odebrány vždy ve 4., 6. a 8. týdnu březosti jalovic. Vzorky moči deseti nebřezích jalovic byly opakovaně odebírány v nepravidelných intervalech od května do srpna 2014.

5.1.2 Diagnostika březosti z moči lam alpak a oslic

Pro výzkum bylo vybráno celkem dvanáct samic lamy alpaky (typ huacaya). Lamy pocházely ze tří soukromých farem v České republice:

- Farma pana Radka Vaňka, Líska, Česká Kamenice
- Alpakafarma.cz, paní Eleonora Hlaváčová, Veská, Pardubice
- Farma paní Jany Dufkové, Zámostí-Blata, Jičín

Všechny samice byly nejméně rok staré. Pastva a seno tvořily základ stravy všech samic. Strava byla doplňována koncentráty pro lamy. K oplození samic došlo jejich připuštěním k samci. Březost byla potvrzena porodem nebo v některých případech koncentrací progesteronu v krvi. Odběry vzorků moči lam alpak, osmi březích a čtyř nebřezích, probíhaly od dubna 2013 do února 2014 v šesti až osmi týdenních intervalech. Jedna samice během období výzkumu porodila a znovu zabřezla. Moč alpak odebírala Ing. Anna Kubátová. Ukázka odběru moči lam alpak je na obrázku 11. Na základě informací od chovatelů byla u dvou samic diagnostikovaná parazitóza, u jedné nedostatek zinku v těle a u jedné perzistující žluté tělísko.



Obrázek 11: Odběr moči lam alpak, foto: Anna Kubátová

Dále bylo do výzkumu zařazeno osmnáct pohlavně dospělých oslic ze dvou soukromých farem:

- Farma Zdeňka Tomana, Jistebnice, Ounuz
- Farma pana Jana Bendy a paní Martiny Bendové, Kostelec nad Vltavou

V managementu chovu se tyto farmy lišily. Na farmě v Ounuzi měla zvířata na pastvě k dispozici přístřešky, kdežto v Kostelci byla zvířata přes noc zavírána do stájí. V Ounuzi byl samec ve společném výběhu se samicemi, a tak ke kopulaci docházelo nekontrolovatelně bez řízení chovatele. Nebylo tedy vždy možné stanovit datum spáření. Oproti tomu na farmě v Kostelci byl samec v odděleném výběhu. Pouze v době říje byla samice umístěna do stejného výběhu se samce. V případě, že říjilo více samic současně, byly k hřebci do výběhu převedeny společně. Moč oslic byla odebírána Ing. Lucií Hejzlarovou.

5.1.3 Diagnostika ze slin a faktory ovlivňující krystalizaci

Pro hodnocení krystalizace ve slinách byly vzorky získávány autorkou práce přímo z tlamy osmi krav Holštýnského plemene (*Bos taurus*) ze Školního zemědělského podniku Láň-Ruda, České zemědělské univerzity v Praze. Krávy byly 2-3 roky staré, s prvním otelením v roce 2011. Samice byly zařazeny do programu synchronizace říje, který započal 9. srpna první aplikací 3 ml Supergestranu (NORDIC Pharma, s.r.o.). Aplikace Supergestranu byla zopakována 16. srpna. O týden později byly aplikovány 3 ml Rmophanu (Bioveta, a.s.) a 26. srpna 2011 byly samice uměle inseminovány.

Odběr vzorků slin od samic holštýnského skotu probíhal od 10. srpna do 29. září 2011. Sliny byly odebírány denně po ranním dojení v období mezi 16. dnem před umělou inseminací až do 34. dne po umělé inseminaci, tedy v celkovém rozmezí 51 dní.

Vzorky slin na hodnocení faktorů, jež mohou ovlivnit krystalizaci byly odebírány nepravidelně od jednoho samce a dvou samic velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) ze zoologické zahrady v Praze ošetřovatelem od září do října 2014 přímo z tlamy zvířete, konkrétně z jazyka, pomocí jednorázových plastových lžic a plastových kávových míchátek. Pro lepší produkci slin byl ke stimulaci slinění použit suchý chleba podávaný během odběru slin (Haberová et al., 2012). Všechna zvířata byla pohlavně dospělá, držena ve společném výběhu a měla stejné složení krmné dávky (seno, zelená píče, doplňkový granulát pro býložravce C, mrkev).

5.2 Skladování vzorků a manipulace s nimi

5.2.1 Diagnostika březosti z moči

Vzorek moči určený pro test klíčivosti semen a test s chloridem barnatým byl z plastového kelímku přelit do 3 uzavíratelných plastových nádobek (objem 20 nebo 60 ml), které byly řádně označeny. Vzorek moči pro Cubonihovu reakci byl vždy v nádobce o objemu

20 ml. Ihned po skončení odběrů byly tyto nádoby zchlazeny na 5-7 °C v chladničce (Haberová et al., 2011). Do laboratoře Katedry chovu zvířat a potravinářství v tropech, Fakulty tropického zemědělství, České zemědělské univerzity v Praze (KCHZPT FTZ ČZU v Praze) byly vzorky převezeny v autochladničce nejpozději během dvanácti hodin po skončení odběrů. Vzorky moči pro test klíčivosti semen a test s chloridem barnatým byly zpracovány ještě týž den. Vzorky moči pro Cubonihovo reakci byly dopraveny do Státního veterinárního ústavu v Praze (SVÚ) v nejbližší možný pracovní den.

Vzorek moči určený pro hormonální analýzu byl z plastového kelímku přelit do 3 zkumavek Eppendorf s víčkem (objem 3 nebo 5 ml) a řádně označen. Každá zkumavka Eppendorf se vzorkem moči byla určena pro stanovení jednoho hormonu. Po skončení odběrů byly vzorky ihned zamrazeny v -20 °C (Volkery et al., 2012). Vzorky byly do laboratoře přepraveny v jiné autochladničce obložené zmrazovacím gelem, aby nedošlo k rozmražení vzorků. Tyto vzorky moči byly uchovány při teplotě -20 °C až do vlastní analýzy (Heistermann et al., 1997; Volkery et al., 2012).

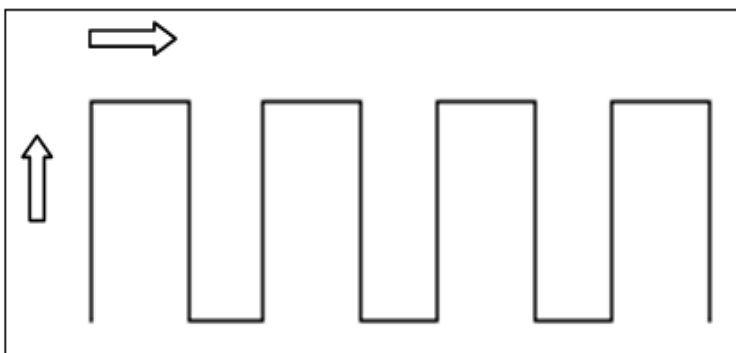
5.2.2 Krystalizace slin

Pro hodnocení typů krystalizace a změn v krystalizaci byly sliny skotu odebírány ošetřovatelem sterilním jednorázovým kávovým míchátkem (Haberová, 2010) a ihned po odběru byly rozetřeny na čisté podložní sklíčko. Takto připravené vzorky byly jednou týdně přepravovány v plastovém nebo kartónovém boxu (obrázek 12) do laboratoře KCHZPT FTZ ČZU v Praze, kde byly ihned vyhodnoceny světelným mikroskopem při zvětšení x400.



Obrázek 12: Vybavení pro odběr a přepravu vzorků slin holštýnského skotu, foto: Autorka

Vzorky slin byly pro hodnocení faktorů potencionálně ovlivňujících krystalizaci plastové lžice pomocí míchátka shrnuty do zkumavky, řádně popsány a převezeny do laboratoře KCHZPT FTZ ČZU v Praze, kde byly ihned zpracovány a opět mikroskopicky vyhodnoceny při zvětšení x400 (Haberová et al., 2012). Na obrázku 13 je znázorněno, jak se postupovalo při vyhledávání a hodnocení krystalizace ve vzorku slin rozetřeného na podložní sklíčko.



Obrázek 13: Znázornění systému vyhledávání krystalizace ve vzorku slin rozetřeného na podložním sklíčku (zdroj obrázku: Autorka)

5.3 Příprava a vyhodnocení vzorků

5.3.1 Diagnostika březosti z moči

5.3.1.1 Test klíčivosti semen

V rámci této disertační práce byla klíčivost semen sledována u českého strakatého skotu. Všechny vzorky byly zpracovány autorkou práce.

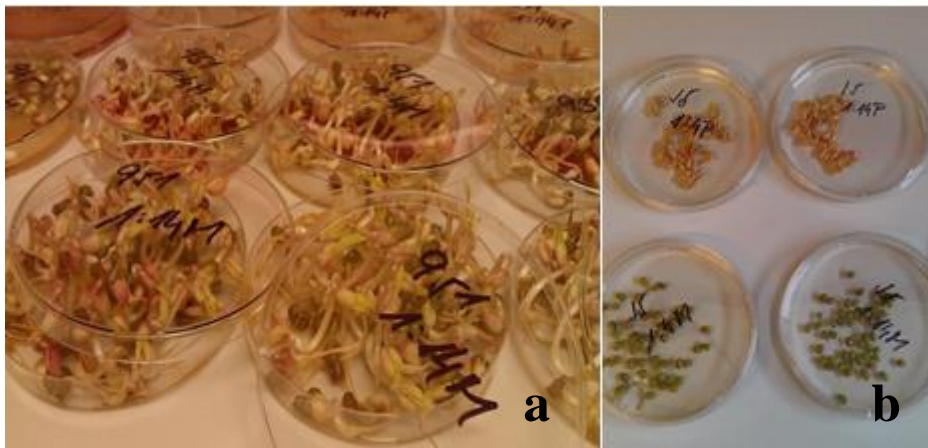
A) První fáze výzkumu

Každý vzorek moči byl zředěn destilovanou vodou do dvou koncentrací: 1:4 (1 díl moči : 4 díly vody) (Narayana Swamy et al., 2010) a 1:14 (1 díl moči : 14 dílů vody) (Dilrukshi & Perera, 2009). Vždy 20 ml připraveného roztoku z 1 vzorku moči bylo nalito do Petriho misky s 50 semeny mungo fazolí (*Vigna radiata*) nebo 50 semeny pšenice špaldy (*Triticum spelta*). Pro jeden vzorek moči byly založeny čtyři testy klíčivosti semen: 1) 50 fazolí mungo v roztoku 1:4 2) 50 fazolí mungo v roztoku 1:14 3) 50 semen pšenice špaldy v roztoku 1:4 a 4) 50 semen pšenice špaldy v roztoku 1:14. Každý test klíčivosti byl proveden ve dvou sadách.

Po dobu pěti dnů byly připravené vzorky ponechány v laboratoři při teplotě okolo 25 °C (Obrázek 14a a 14b). Denně přibližně ve stejnou hodinu se spočítal počet vyklíčených semen v jednotlivých Petriho miskách. Pátý den testu se pravítkem změřila délka všech klíčků v jednotlivých Petriho miskách.

B) Druhá fáze výzkumu

Opět byly připraveny dvě koncentrace roztoku moč : destilovaná voda a to 1:4 a 1:14. Vždy 20 ml připraveného roztoku z 1 vzorku moči bylo nalito do Petriho misky s 50 semeny mungo fazolí nebo 50 semeny pšenice seté (*Triticum aestivum*). Pro jeden vzorek moči byly založeny čtyři testy klíčivosti semen bez opakování: 1) 50 fazolí mungo v roztoku 1:4 2) 50 fazolí mungo v roztoku 1:14 3) 50 semen pšenice seté v roztoku 1:4 a 4) 50 semen pšenice seté v roztoku 1:14.



Obrázek 14a a 14b: Test klíčivosti semen, foto: Autorka

Připravené vzorky byly ponechány v laboratoři tři dny při teplotě okolo 25 °C. Denně se spočítal počet vyklíčených semen v jednotlivých Petriho miskách a třetí den se pravítkem změřila délka všech klíčků v jednotlivých Petriho miskách.

Dále byly připraveny kontrolní varianty testu klíčivosti semen, které obsahovaly pouze destilovanou vodu (Veena & Naredranath, 1993; Narayana Swamy et al., 2010). Do Petriho misky s 50 fazolemi mungo nebo 50 semeny pšenice seté bylo aplikováno 20 ml destilované vody. Kontrolní varianty vzorků byly také ponechány v laboratoři tři dny při teplotě okolo 25 °C. Počet vyklíčených semen na destilované vodě byl počítán denně, třetí den testu klíčivosti byla délka klíčků změřena pravítkem.

5.3.1.2 Cubonihova reakce

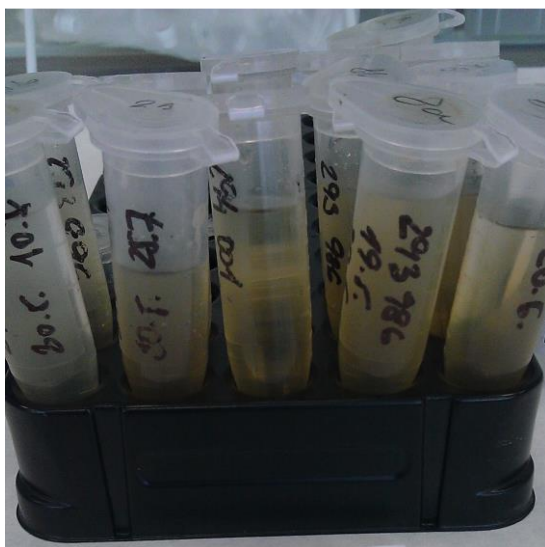
Cubonihova reakce byla provedena Státním veterinárním ústavem v Praze, kde je tato metoda standardizována pro detekci březosti u klisen. Provedení Cubonihova reakce bylo u všech skupin testovaných zvířat (český strakatý skot, lamy alpaky, oslice) stejné.

Postup Cubonihova reakce byl následující: 5 ml přefiltrované moči se smíchalo ve zkumavce s 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Poté byla zkumavka dána do vodní lázně na 10 minut. Po zchlazení bylo přidáno 6 ml toluenu a roztok se pořádně zamíchal. Po jedné minutě došlo k oddělení dvou vrstev. Spodní vrstva s toluenem byla oddělena a filtrována do čisté zkumavky obsahující 1 ml kyseliny sírové. Po důkladném promíchání, byla zkumavka dána opět do vodní lázně (o teplotě 80 °C) přibližně na 15 minut. Po zchlazení byla vyhodnocena barva opalescence ve zkumavce, vždy proti tmavému pozadí (Čadová, 2013).

5.3.1.3 Analýza reprodukčních hormonů v moči

Analýzy byly prováděny na Katedře veterinárních disciplín na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze (dále jen KVD).

Příprava vzorků a protokol vlastní analýzy probíhaly dle instrukcí stanovených výrobcem použitých kitů (DetectX[®], Arbor Assays, USA). Před vlastním procesem stanovení koncentrace reprodukčních hormonů se vzorky moči nechaly rozmraznout při pokojové teplotě v laboratoři KVD (Obrázek 15).



Obrázek 15: Rozmražené vzorky moči připravené k vlastní hormonální analýze, foto: Autorka

Použité kity

Hormony (estron, 17- β -estradiol a pregnandiol-3-glukuronid) se stanovovaly z moči krav, alpak a oslic pomocí kompetitivní heterogenní enzymové imunoanalýzy (competitive heterogeneous enzyme immunoassay). Konkrétně byly použity komerční kity: Estrone Enzyme Immunoassay Kit, 17- β -estradiol Enzyme Immunoassay Kit a Pregnandiol-3-Glucuronide Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, USA).

Ředění vzorků moči českého strakatého skotu

Ředění vzorků testovacím pufrem (Assay Buffer) je vyobrazeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Ředění vzorků moči českého strakatého skotu

pregnandiol-3-glukuronid	březí jalovice	1:12	13x
	nebřezí jalovice	1:4	5x
17- β -estradiol	březí jalovice	1:1	2x
	nebřezí jalovice	1:1	2x
estron sulfát	březí jalovice	1:9	10x
	nebřezí jalovice	1:4	5x

(1 díl vzorku, x dílů pufru)

Ředění vzorků moči lam alpak a oslic

Ředění vzorků testovacím pufrem (Assay Buffer) je vyobrazeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Ředění vzorků moči lam alpak a oslic

pregnandiol-3-glukuronid	březí alpaka	1:14	15x
	nebřezí alpaka	1:9	10x
	březí oslice	1:14	15x
	nebřezí oslice	1:9	10x
estron sulfát	březí alpaka	1:14	15x
	nebřezí alpaka	1:9	10x

(1 díl vzorku, x dílů pufru)

Příprava standardních roztoků

Standardní vzorky byly připravovány pomocí sériového ředění standardního roztoku (tj. roztok o známé koncentraci daného hormonu). Ředění bylo prováděno testovacím pufrem (Assay Buffer).

Protokol vlastní analýzy

Analýza byla založena na principu reakce antigen-protilátka. Do každé mikrotitrační jamky se dal společně inkubovat protilátka, hormon konjugovaný s enzymem (hormone-peroxidase conjugate) (označený antigen, Ag*) a vzorek/standardní roztok (neoznačený antigen, Ag). Označeného antigenu bylo vždy menší množství než protilátky, aby mohlo dojít ke kompetici o vazebná místa na protilátce.

Při inkubaci došlo k vytvoření imunokomplexů Ab-Ag; Ab-Ag*, a zůstaly také volné antigeny (Ag, Ag*). Po inkubaci se destička promyla promývacím roztokem (Wash Buffer), tím došlo k odstranění volných antigenů. Poté se přidal TMB¹ substrát (TMB substrate), který enzym využil a vznikl tak barevný produkt, který bylo možno změřit. Enzymatická reakce se musela zastavit pomocí zastavovacího roztoku² (Stop Solution). Množství produktu bylo nepřímě úměrné množství hledaného analytu.

Vyhodnocení analýzy

Vyhodnocení bylo provedeno měřením absorbance spektrofotometrem (VersaMax ELISA reader, Molecular Devices, USA) při vlnové délce $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Obrázek 16). Pomocí standardních roztoků byla sestavena 4PL kalibrační křivka (4 parameter logistic calibration curve), ze které byly odečteny koncentrace zjišťovaných hormonů ve vzorcích moči (pomocí softwaru SoftMax Pro 5, Molecular Devices, USA).

¹ TMB = 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

² Stop solution = 1M HCl



Obrázek 16: Vyhodnocení analýzy spektrofotometrem (VersaMax ELISA reader, Molecular Devices, USA) při vlnové délce $\lambda = 450 \text{ nm}$, foto: Autorka

5.3.1.4 Test s chloridem barnatým

Metodika a vyhodnocení testu s chloridem barnatým probíhaly shodně u všech tří skupin testovaných zvířat (český strakatý skot, lamy alpaky, oslice). Pět ml moči bylo pipetou aplikováno do zkumavky, následně bylo pipetou postupně přidáváno 5 ml 1% roztoku BaCl_2 (Krishna Rao & Veena, 2009; Lalrintluanga & Dutta, 2009). Po pěti minutách se test vyhodnotil jako pozitivní (v případě, že se objevila bílá sraženina, usazenina, značné zakalení, jak je viditelné na obrázku 17 nebo jako negativní, v případě, že nedošlo k patrné reakci (Ndu et al., 2000a; Ndu et al., 2000b). Tento test byl prováděn autorkou práce nebo pod jejím dozorem (Ing. Annou Kubátovou u alpak a Ing. Lucií Hejzlarovou u oslic).



Obrázek 17: vyhodnocení testu s chloridem barnatým, foto: Autorka

5.3.1.5 Semikvantitativní analýzy moči

Ihned po odebrání vzorku moči bylo změřeno pH moči pomocí indikačních papírků Duotest[®] s rozmezím pH 7,0-10,0 (Macherey-Nagel GmbH &Co. KG, SRN) (Obrázek 18). Pomocí diagnostických proužků DekaPhan[®] Leuco (Erba Lachema s.r.o., Česká republika) určených pro semikvantitativní analýzu lidské moče (Obrázek 19) byly zjištěny následující parametry: pH, specifická hmotnost, přítomnost leukocytů, nitritů, bílkovin, glukózy, ketonů, urobilinogenu, bilirubinu, krve případně hemoglobinu. Pro možnost vypočítat přesnější hodnotu specifické hmotnosti byla ihned po odebrání vzorku změřena aktuální teplota a hustota moči. U českého strakatého skotu bylo po odebrání vzorku provedeno subjektivní hodnocení barvy moči.



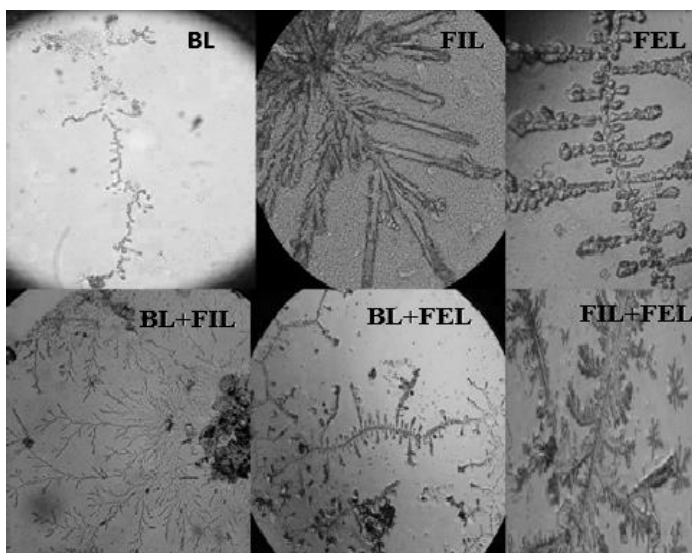
Obrázek 18: Vybavení pro semikvantitativní analýzu moči, foto:
Autorka



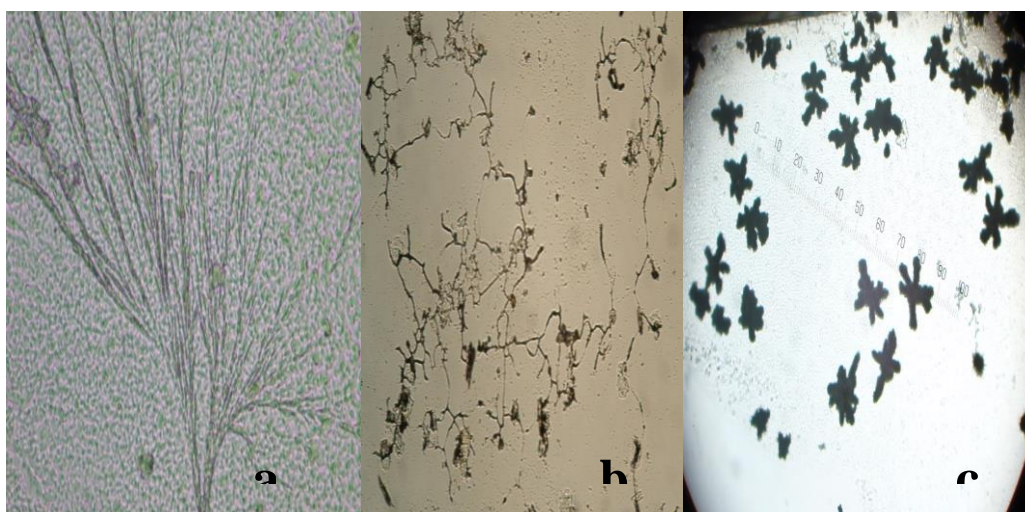
Obrázek 19: Vyhodnocení semikvantitativních analýz moči, foto:
Autorka

5.3.2 Krystalizace slin

Na určení typu krystalizace byl aplikován hodnotící systém stanovený Haberovou (2010). Ve slinách skotu byly popisovány tyto hlavní typy krystalizace: žádná (0), tečkovaná (D), větvičkovitá (BL), větvičko-jedlovitá (BL + FIL), jedlovitá (FIL), jedlovito-kaprad'ovitá (FIL + FEL), kaprad'ovitá (FEL) nebo jejich kombinace. Dále byl zaznamenáván i výskyt atypické krystalizace (A). V jednom vzorku slin byl vždy popsán pouze jeden typ krystalizace. Za jeden typ však byly považovány i kombinace zmíněných hlavních typů krystalických útvarů. Obrázek 20 znázorňuje hlavní typy krystalů vyskytujících se ve slinách holštýnského skotu, vyjma žádné a tečkované. Na obrázku 21 je vyobrazena atypická krystalizace.



Obrázek 20: Hlavní typy krystalizace ve slinách holštýnského skotu, foto: Autorka



Obrázek 21: Ukázka atypické krystalizace ve slinách holštýnského skotu, foto: Autorka

Pro hodnocení faktorů, jež mohou ovlivnit krystalizaci, byly vzorky velbloudích slin v laboratoři rozetřeny na čistá podložní sklíčka. Jméno zvířete, testovaný faktor a číslo vzorku bylo vždy řádně označeno na podložním sklíčku. Jako faktory, které mohou ovlivnit krystalizaci slin, byly vybrány následující dva: teplota při zasychání nanesených vzorků slin a změna koncentrace slin (ředěním vzorků slin nebo přidavkem soli do vzorku slin).

Kontrolní vzorky: na podložní sklíčko byla nanесena středně silná vrstva slin a vzorky se nechaly zaschnout při pokojové teplotě v laboratoři, vždy deset sklíček se slinami samičími a deset se slinami samčími. Kontrolní vzorky byly připravovány z každého odběru.

Pro otestování vlivu teploty na krystalizaci slin během zasychání vzorků byly vybrána teplota nižší a vyšší než pokojová, tedy 4 °C a 65 °C. Pokojová teplota byla stanovena na 21 °C. Vzorky pro otestování vlivu nízké teploty byly ponechány při zasychání v chladničce. Podložní sklíčka se slinami pro otestování vlivu vysoké teploty byla ponechána při zasychání na víku od nádoby, která byla naplněna vodou o teplotě 65 °C. Opět bylo připraveno 10 vzorků pro každou testovanou teplotu, a to jak se slinami od samice, tak i od samce. Celkem bylo takto testováno 40 vzorků.

Druhým testovaným faktorem byla změna koncentrace slin. V první řadě bylo provedeno ředění vzorku. Jeden ml slin byl sterilní injekční stříkačkou přenesen do Petriho misky, kam bylo poté přidáno 0,2 ml destilované vody. Pomocí jednorázového plastového kávového míchátka byla směs slin s destilovanou vodou promíchána. Takto připravený vzorek byla ve středně silné vrstvě nanесen na podložní sklíčko a ponechán zaschnout při pokojové teplotě. Celkem bylo připraveno 20 vzorků, 10 se slinami samičími a 10 se slinami samčími.

V druhé řadě byla koncentrace slin změněna přidavkem soli. Pomocí sterilní stříkačky byl do Petriho misky aplikován 1 ml slin a k němu bylo přidáno 0,5 g kuchyňské soli (NaCl). K promíchání směsi slin se solí bylo opět použito jednorázové plastové kávové míchátko. Takto připravený vzorek byl rozetřen na podložní sklíčko ve střední vrstvě a zasychal při pokojové teplotě. Celkem bylo testováno 10 vzorků samičích slin a 10 vzorků slin samčích, dohromady tedy 20.

Vzorky, které byly připraveny na otestování vlivu různých faktorů na krystalizaci slin, byly vždy porovnány s kontrolními vzorky. Na základě změn, které byly pozorovány mezi testovacími vzorky a vzorky kontrolními, byly vyhodnocovány vlivy dvou zmíněných faktorů na krystalizaci ve slinách.

Vyhodnocení krystalizace bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu se zvětšením $\times 400$. U všech vzorků byl hodnocen typ krystalizace a změny v typu krystalizace vlivem faktorů.

Byly hodnoceny tři typy krystalizace (větvičkovitá, jedlovitá, kaprad'ovitá a jejich možné kombinace). Krystalizace slin byla vyhodnocována autorkou práce nebo pod jejím dozorem (vzorky slin od velbloudů byly vyhodnocovány Ing. Annou Kubátovou).

5.4 Statistické analýzy

Všechna získaná data byla zpracována do tabulek a vyhodnocena pomocí programu Statistica CZ 12 program (StatSoft, Inc., 2013). Pro všechny analýzy byla stanovena hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

5.4.1 Diagnostika březosti z moči českého strakatého skotu

A) První fáze výzkumu

Počet vyklíčených semen v zředěné moči i konečné délky klíčků byly porovnány mezi březími a nebřezími jalovicemi. Březost jalovic byla rozdělena do šesti fází: 0–50 dní, 51–100 dní, 101–150 dní, 151–200 dní, 201–250 dní a březí více než 250 dní. Výsledky testu klíčivosti semen z těchto fází březosti byly porovnány s výsledky u nebřezích jalovic. Zároveň byly porovnány výsledky semikvantitativních analýz moči. Možný vliv dodatečných charakteristik moči na klíčivost semen, jmenovitě barva moči, přítomnost proteinů, specifická hmotnost, pH a urobilinogen, byl pro kontrolu vyhodnocen u nebřezích jalovic.

Jelikož normální rozdělení dat nebylo prokázáno (Shapiro–Wilkův test, $p < 0,01$), byla data vyhodnocena pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu s vícenásobným porovnáním P hodnot. Délka klíčků byla statisticky vyhodnocena využitím metody ANOVA doplněna o Tukeyův post hoc test, kvůli rozsáhlému množství dat. Vliv specifické hmotnosti a pH na počet vyklíčených semen byl otestován pomocí Spearmanových korelací. Vliv barvy moči a přítomnosti urobilinogenu byl otestován využitím Mann-Whitneyho U testu, a vliv přítomnosti proteinu pomocí Kruskal-Wallisova testu.

B) Druhá fáze výzkumu

Normální rozdělení dat nebylo prokázáno, a tak vliv březosti na klíčivost semen v zředěné moči byl vyhodnocen pomocí Mann-Whitneyho U testu. Vliv březosti na délku klíčků byl statisticky otestován využitím metody ANOVA. Koncentrace reprodukčních hormonů v moči březích a nebřezích jalovic byla vyhodnocena Mann-Whitneyho U testem. Souvislost mezi reprodukčními hormony a výsledky testů klíčivosti semen, počet vyklíčených semen a délka klíčků, byla otestována pomocí Spearmanových korelací.

5.4.2 Diagnostika březosti z moči lam alpak a oslic

U lam alpak nebylo prokázáno normální rozdělení dat (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,05$). Pouze u výsledků z délek klíčků byl použit parametrický test. Výsledky měření délek klíčků byly vyhodnoceny pomocí nepárového t-testu a metodou ANOVA. Ostatní data se

hodnotila pomocí následujících neparametrických testů: Kruskal-Wallis test, Mann-Whitneyův U test, Pearsonův chí-kvadrát test, Wilcoxonův test (signed rank).

Jelikož ani u oslic nebylo prokázáno normální rozdělení dat (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,05$), byly použity následující neparametrické testy: Kruskal-Wallis test, Mann-Whitneyův U test, Pearsonův chí-kvadrát test, a Wilcoxonův test (signed rank).

5.4.3 Krystalizace slin

K statistickým analýzám dat byly využity tabulky četností, kontingenční tabulky a Pearsonův chí-kvadrát test.

6 Výsledky

6.1 Diagnostika březosti z moči

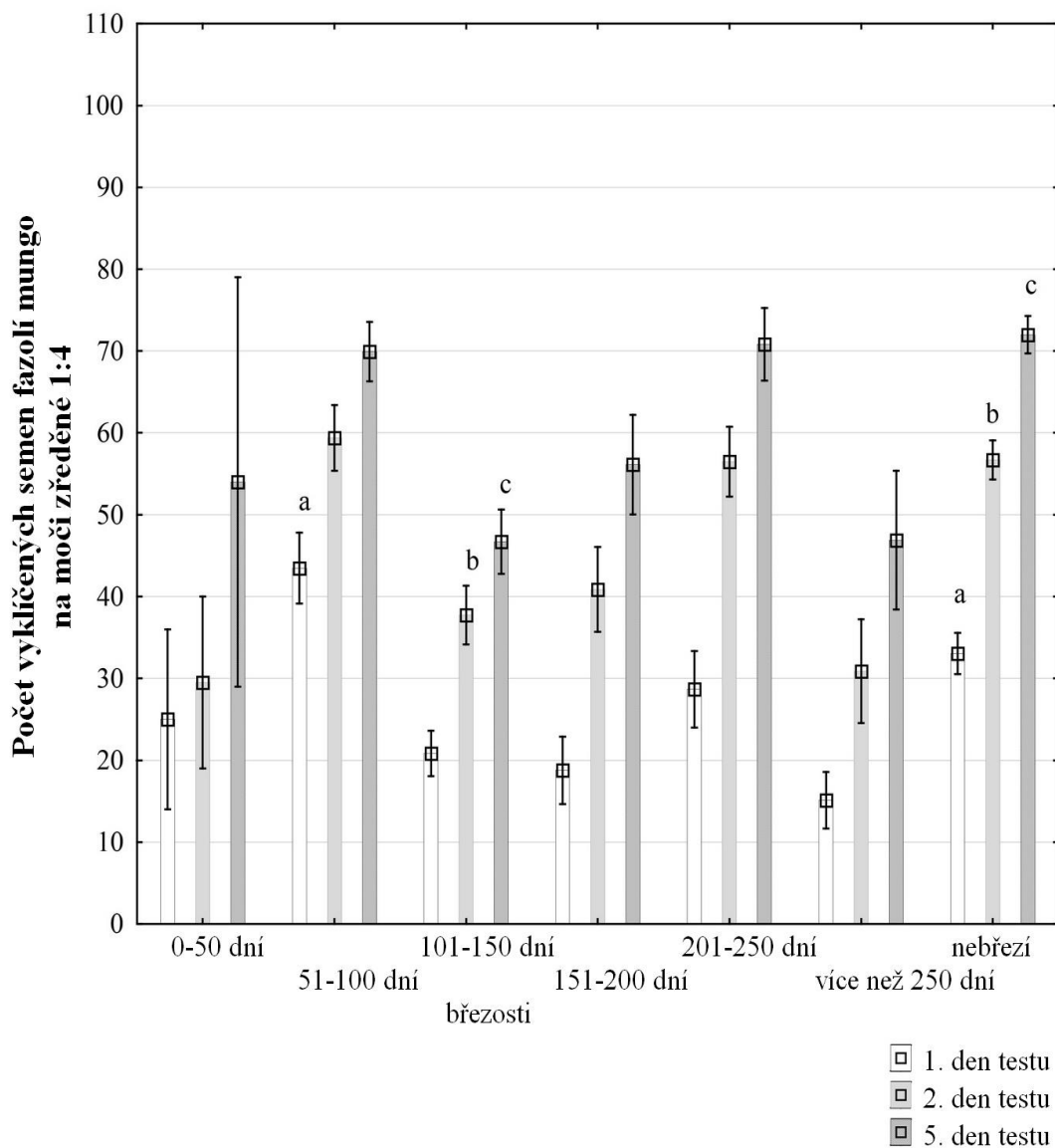
6.1.1 Test klíčivosti semen

A) První fáze výzkumu

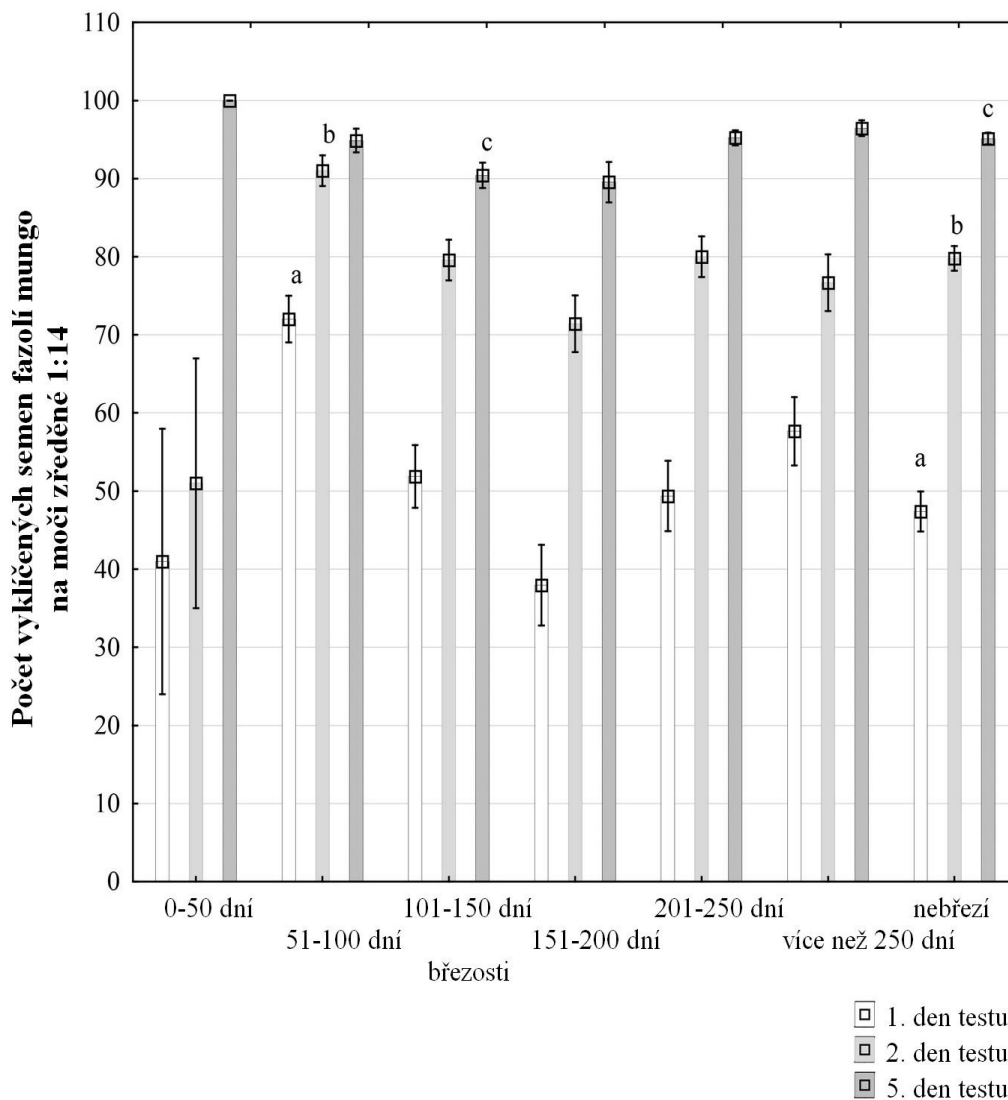
Celkem bylo odebráno 143 vzorků moči dvaceti březích jalovic a 150 vzorků moči dvaceti nebřezích jalovic. Celkem bylo spočítáno 37218 vyklíčených semen.

Počet vyklíčených semen

Během prvního dne testu klíčivosti semen bylo napočítáno méně vyklíčených semen fazolí mungo na moči od nebřezích jalovic než na moči jalovic březích 51-100 dní u obou testovaných koncentrací ($p < 0,05$ pro koncentraci 1:4 a $p < 0,0001$ pro koncentraci 1:14). Od třetího dne až do konce testu, opět v případě obou testovaných koncentrací, byl statisticky významně vyšší počet vyklíčených semen mungo fazolí na moči nebřezích jalovic než na moči těch březích v gestační fázi 101-150 dní ($p < 0,01$). Detailnější informace jsou vyobrazeny na obrázku 22 a 23.



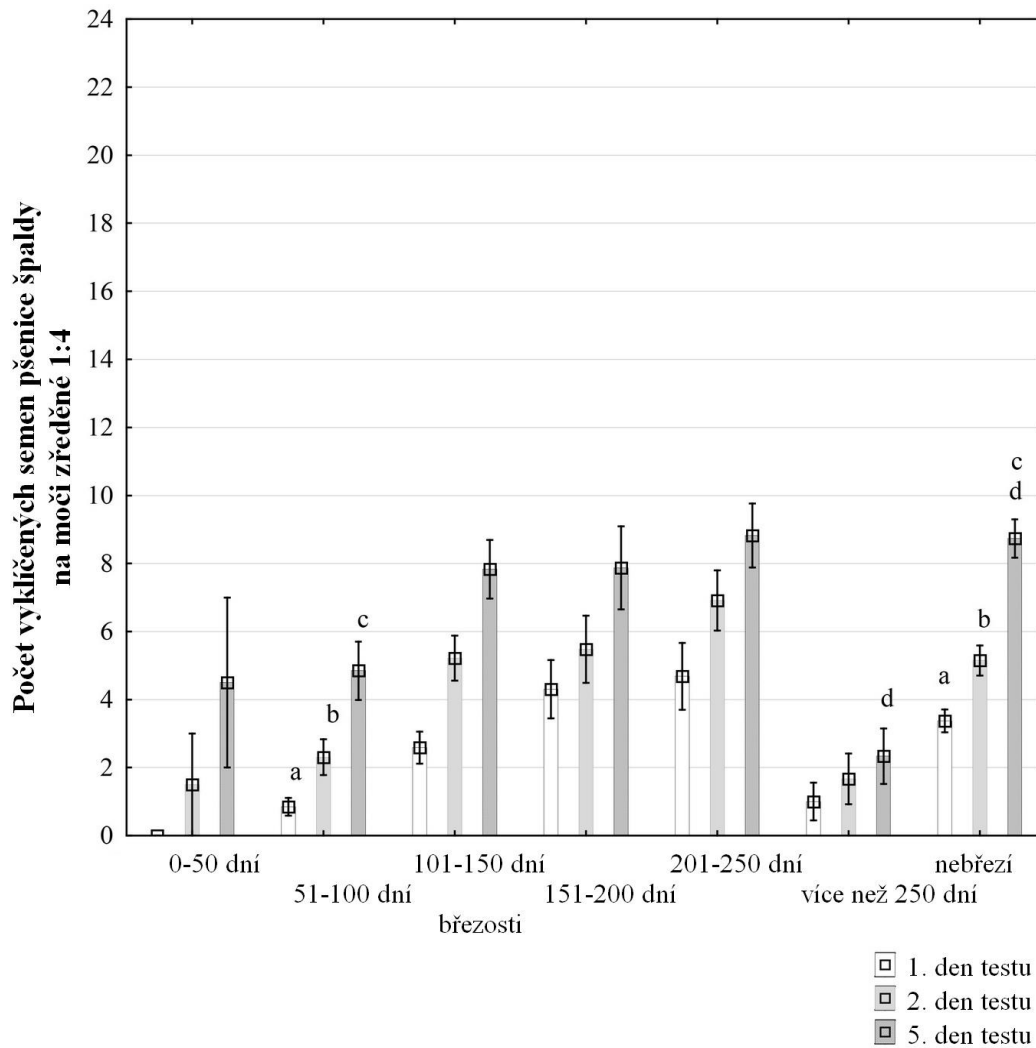
Obrázek 22: Počet vyklíčených semen fazolí mungo na moči zředěné 1:4, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SE ($p < 0,0001$ pro c; $p < 0,05$ pro a,b)



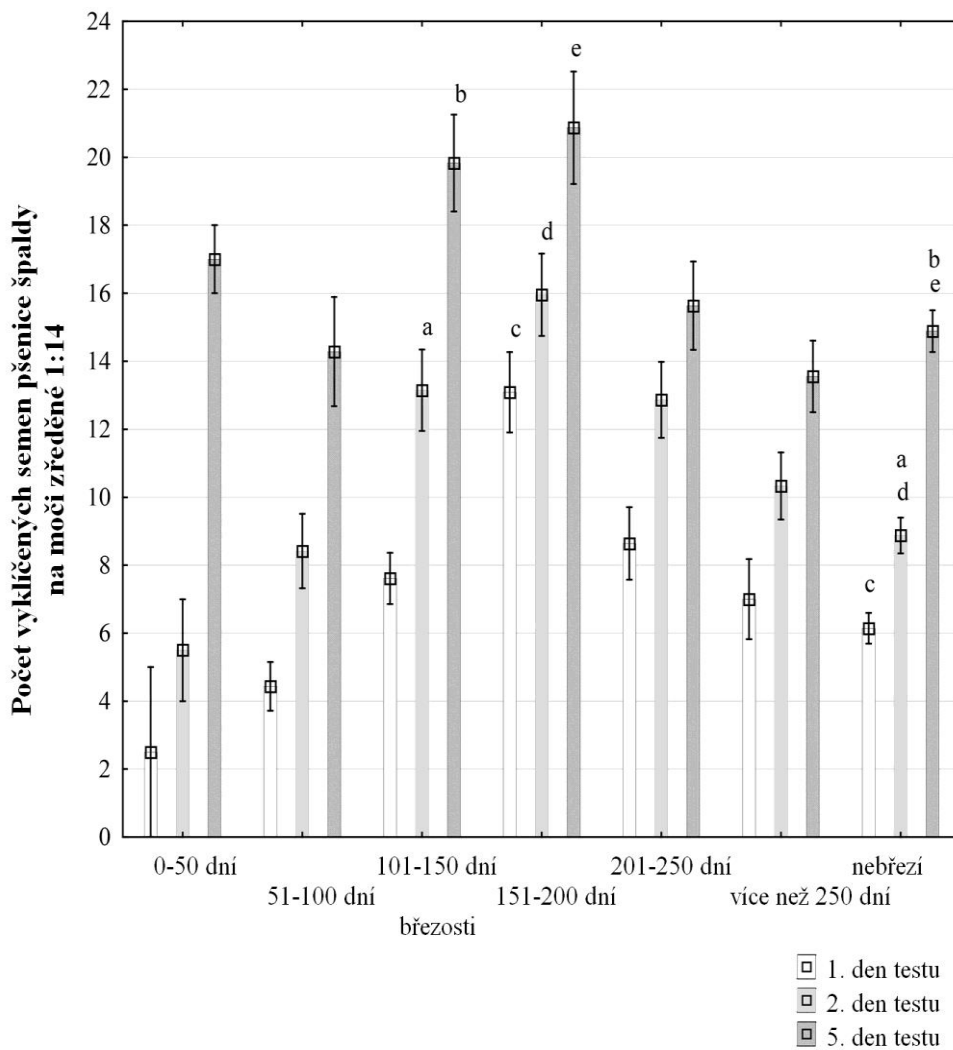
Obrázek 23: Počet vyklíčených semen fazolí mungo na moči zředěné 1:14, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SE ($p < 0,0001$ pro a, b, c)

Počet vyklíčených semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:4 byl statisticky významně vyšší ($p < 0,01$) po celých pět dní testu klíčivosti u nebřezích jalovic než u březích 51-100 dní (obrázek 24). Dále bylo pátý den testu napočítáno více vyklíčených semen pšenice špaldy na moči od nebřezích samic než na moči od březích více než 250 dní ($p < 0,05$). Oproti tomu lepší klíčení semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:14 bylo pozorováno u březích jalovic (obrázek 25). První den testu klíčivosti byl zjištěn statisticky významně nižší počet vyklíčených semen ($p < 0,0001$) na moči od nebřezích jalovic než na moči od jalovic březích

151-200 dní. Od druhého do pátého dne testu pšenice špalda statisticky významně méně klíčila ($p < 0,05$) na moči nebřezích jalovic oproti moči těch březích v gestační fázi 101-150 dní a 151-200 dní.



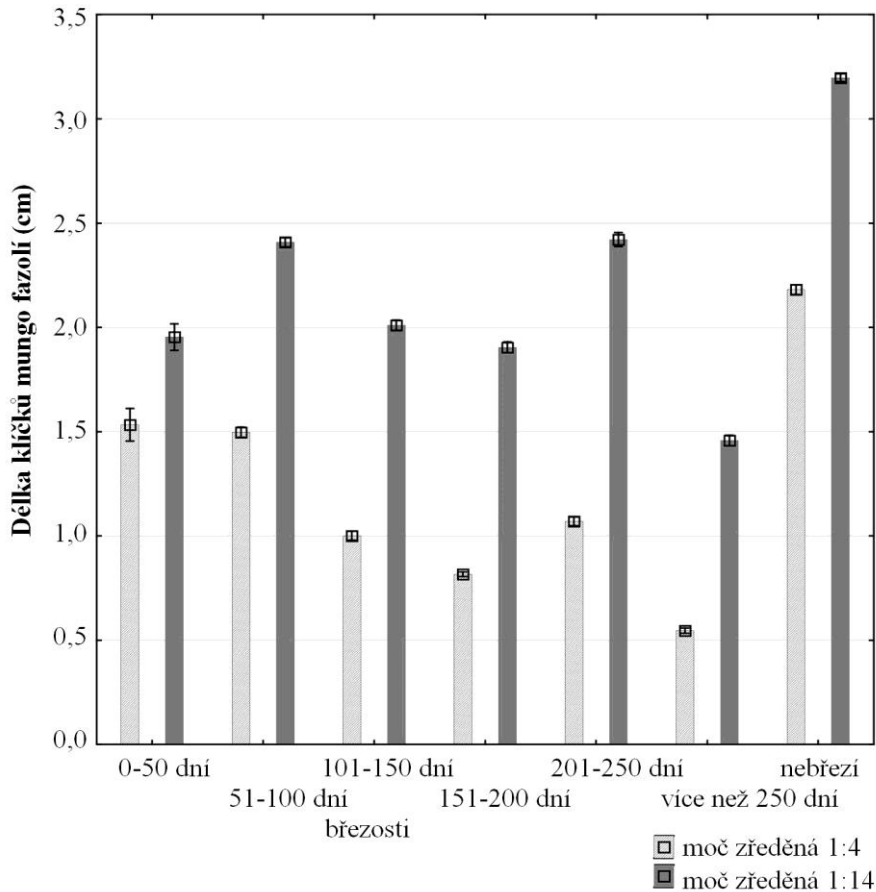
Obrázek 24: Počet vyklíčených semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:4, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SE ($p < 0,001$ pro a,b,c; $p < 0,05$ pro d)



Obrázek 25: Počet vyklíčených semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:14, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SE ($p < 0,001$ pro a,c; $p < 0,01$ pro d; $p < 0,05$ pro d)

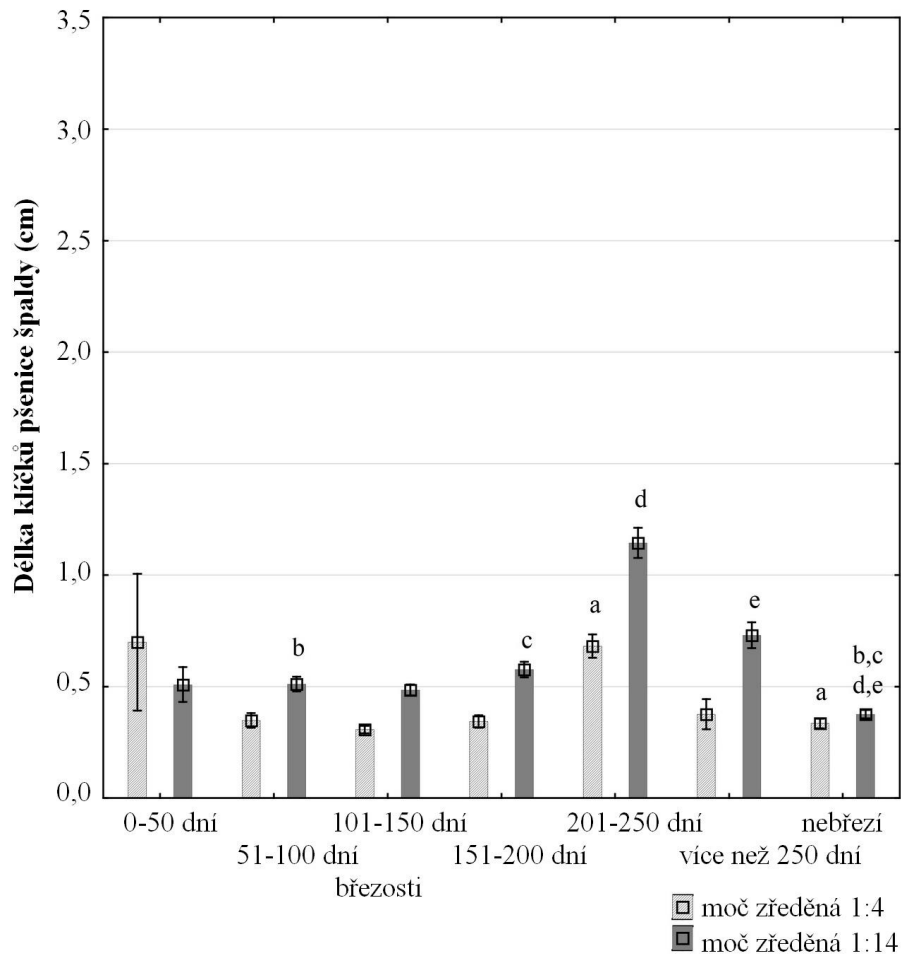
Délka klíčků

Délka klíčků mungo fazolí byla statisticky významně kratší ($p < 0,0001$) u semen, která klíčila na moči od březích jalovic, bez ohledu na koncentraci roztoku moč : destilovaná voda. Jak je vidět na obrázku 26, nejvíce se délka klíčků lišila mezi nebřezími jalovicemi a březími více než 250 dní.



Obrázek 26: Délka klíčků vyklíčených fazolí mungo na zředěné moči, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovice. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SE ($p < 0,0001$)

Oproti výsledkům testu s mungo fazolemi, měření klíčků pšenice špaldy ukázalo opačnou tendenci. Z obrázku 27 je patrné, že kratší klíčky pšenice špaldy byly obvykle naměřeny u vzorků s močí nebřezích jalovic. Pouze u varianty s koncentrací 1:4 byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) naměřen mezi nebřezími samicemi a jalovicemi březími mezi 200. a 250.dnem. Délky klíčků semen pšenice špaldy vyklíčených na moči nebřezích a březích jalovic v různých gestačních fázích zředěné 1:14 jsou také vyobrazeny na obrázku 27.



Obrázek 27: Délka klíčků semen pšenice špaldy vyklíčených zředěné moči, březost jalovic rozdělena do 6 fází vs. nebřezí jalovici. Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SE ($p < 0,0001$ pro a,d,e; $p < 0,001$ pro c; $p < 0,05$ pro b)

B) Druhá fáze výzkumu

Celkem bylo odebráno 36 vzorků moči dvanácti březích jalovic během tří odběrů a 50 vzorků moči deseti nebřezích jalovic v rámci pěti odběrů. V průběhu testu klíčivosti semen bylo spočítáno 6692 vyklíčených semen. V kontrolních vzorcích, které obsahovaly jen destilovanou vodu, bylo použito 200 semen mungo fazolí a 200 semen pšenice seté.

Počet vyklíčených semen

Během prvních dvou dní testu klíčivosti nebyl počet vyklíčených mungo fazolí na moči zředěné v obou koncentracích ovlivněn březostí jalovic ($p > 0,05$). Poslední den testu (3.den) byl statisticky významně nižší počet klíčků fazolí mungo spočítán na vzorcích s močí

od březích jalovic ($p = 0,02$ a $p = 0,015$ pro koncentrace 1:4 a 1:14, v uvedeném pořadí). Detailnější přehled je zobrazen v tabulce 4

Tabulka 4: Počet vyklíčených semen fazolí mungo a pšenice seté na zředěné moči březích a nebřezích jalovic v průběhu tří dnů testu klíčivosti semen

Test	Den	Březí jalovice		Nebřezí jalovice		p
		Průměr	SE	Průměr	SE	
Fazole mungo ředění 1:4	1	12,944	1,632	13,040	1,173	$p = 0,61$
	2	15,389	1,687	19,520	1,674	$p = 0,10$
	3	16,528	1,815	22,540	1,788	$p = 0,02$
Fazole mungo ředění 1:14	1	25,028	1,823	21,980	1,631	$p = 0,23$
	2	30,306	1,582	32,940	1,710	$p = 0,20$
	3	32,639	1,667	37,320	1,727	$p = 0,02$
Semena pšenice ředění 1:4	1	7,250	0,798	5,480	0,533	$p = 0,10$
	2	8,278	0,862	6,700	0,582	$p = 0,23$
	3	8,556	0,889	7,180	0,628	$p = 0,30$
Semena pšenice ředění 1:14	1	14,306	1,087	10,160	0,589	$p < 0,01$
	2	15,333	1,093	12,520	0,764	$p = 0,03$
	3	15,778	1,084	13,880	0,906	$p = 0,12$

Výsledky počtu vyklíčených semen pšenice seté ukázaly opačný trend. Zatímco u varianty s močí zředěnou 1:4 nebyl prokázán statisticky významný vliv březosti jalovic na klíčení pšenice ($p > 0,05$, platné pro všechny tři dny testu), u varianty s koncentrací 1:14 bylo statisticky významně více semen napočítáno ve vzorcích s močí od březích jalovic během prvních dvou dní testu ($p = 0,001$ pro den první, $p = 0,031$ pro den druhý). Při porovnání výsledků testu klíčivosti semen s výsledky kontrolních variant bylo zjištěno, že přítomnost moči ve vzorku, bez ohledu na reprodukční stav samic, negativně ovlivnila klíčení mungo fazolí během celého testu při koncentraci 1:4 ($p = 0,004$, $p = 0,001$ a $p < 0,001$ pro den první, druhý a třetí, v uvedeném pořadí) i 1:14 ($p = 0,005$, $p = 0,008$ a $p = 0,002$ pro den první,

druhý a třetí, v uvedeném pořadí). Stejně tak přítomnost moči ve vzorcích s pšenicí setou ovlivnila její klíčení, jak u koncentrace 1:4 ($p = 0,001$, $p=0,002$ a $p = 0,002$ pro den první, druhý a třetí, v uvedeném pořadí), tak u koncentrace 1:14 ($p < 0,001$, $p < 0,001$ a $p = 0,001$ pro den první, druhý a třetí, v uvedeném pořadí), v porovnání s kontrolními variantami, které obsahovaly pouze destilovanou vodu.

Délka klíčků

Inhibovaný růst klíčků fazolí mungo byl pozorován u vzorků s močí březích jalovic. Statisticky významně kratší klíčky ($p < 0,0001$) měly fazole mungo, které klíčily na moči březích jalovic o koncentraci 1:4 ($F(1,1757)=27,009$) i 1:14 ($F(1,3083)=439,244$). Ani u jedné z testovaných koncentrací zředěné moči březích nebo nebřezích jalovic nebyl prokázán vliv na délku klíčků pšenice seté ($p > 0,05$).

Obecně byla délka klíčků inhibována přítomností moči ve vzorcích, jak v případě mungo fazolí ($p < 0,001$ a $p < 0,001$ pro ředění 1:4 a 1:14, v uvedeném pořadí) tak i pšenice seté ($p < 0,001$ a $p = 0,003$ pro ředění 1:4 a 1:14 v uvedeném pořadí), v porovnání s kontrolními variantami, které obsahovaly pouze destilovanou vodu.

6.1.2 Cuboniho reakce

Spojitost mezi výsledky Cuboniho reakce a reprodukčním stavem jalovic českého strakatého skotu nebyla statisticky významně prokázána (Pearsonův chí-kvadrát: 0,570268, $p > 0,05$).

Od dvanácti lam alpak bylo celkem odebráno 60 vzorků moči a od osmnácti oslic 54 vzorků moči.

Výsledky Cuboniho reakce u nebřezích lam alpak nebyly statisticky významně ($p > 0,05$) ovlivněny sezónností samic. Dále nebyla prokázána statisticky významná souvislost mezi výsledky Cuboniho reakce a skutečným reprodukčním stavem samic ($p > 0,05$), jak v případě nebřezích samic tak i těch březích, i když byla gestační perioda alpak rozdělena na poloviny nebo na třetiny. Ve většině vzorků moči březích i nebřezích alpak byla totiž patrná reakce, jež je znázorněno v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích alpak

Výsledky Cuboniho reakce	Reprodukční stav samic alpak	
	Nebřezí (n = 30)	Březí (n = 28)
Pozitivní	73,33 %	64,29 % *
Negativní	26,67 % *	35,71 %

* výsledek testu odpovídá skutečnému reprodukčnímu stavu samic alpak

V případě nebřezích oslic nebyly výsledky Cuboniho reakce významně ovlivněny ($p > 0,05$) sezónností samic. Statisticky průkazných výsledků ($p < 0,01$) bylo dosaženo až tehdy, kdy březost byla brána v úvahu jako celá gestační perioda, byla rozdělena na poloviny nebo třetiny a výsledky byly porovnány s nebřezími samicemi. Nejvýznamnějších výsledků bylo dosaženo v druhé polovině březosti oslic, kdy spolehlivost Cuboniho reakce vykazovala 100 %. V tabulce 6. jsou zobrazeny výsledky Cuboniho reakce při rozdělení celého období březosti na poloviny. Tabulka 7 pak obsahuje výsledky z Cuboniho reakce, kdy byla gestační perioda oslic rozdělena na třetiny.

Tabulka 6: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích oslic, při rozdělení gestační periody na poloviny

Výsledek Cuboniho reakce	Reprodukční stav oslic		
	Gestační perioda rozdělena na poloviny		
	Nebřezí oslice (n = 23)	1. polovina březosti (n = 14)	2. polovina březosti (n = 17)
Pozitivní	13,04 %	64,29 %*	100,00 %*
Negativní	86,96 %*	35,71 %	0,00 %

*výsledek testu odpovídá skutečnému reprodukčnímu stavu oslic

Tabulka 7: Výsledky Cuboniho reakce u březích a nebřezích oslic, při rozdělení gestační periody na třetiny

Výsledky Cuboniho reakce	Reprodukční stav oslic			
	Gestační perioda rozdělena na poloviny			
	Nebřezí oslice (n = 23)	1. třetina březosti (n = 8)	2. třetina březosti (n = 13)	3. třetina březosti (n = 10)
Pozitivní	13,04 %	50,00 %*	92,31 %*	100,00 %*
Negativní	86,96 %*	50,00 %	7,69 %	0,00 %

*výsledek testu odpovídá skutečnému reprodukčnímu stavu oslic

6.1.3 Analýza reprodukčních hormonů v moči

Koncentrace měřených reprodukčních hormonů, estron sulfátu, 17 β -estradiolu a pregnandiol-3-glukuronidu, v moči březích a nebřezích jalovic českého strakatého skotu jsou znázorněny v tabulce 8.

Tabulka č. 8: koncentrace reprodukčních hormonů (průměr \pm SE) v moči jalovic. Rozdíly v koncentracích hormonů byly mezi březími a nebřezími jalovicemi statisticky průkazné u všech hormonů ($p < 0,001$)

Hormon	Březí jalovice	Nebřezí jalovice
Estron sulfát (pg/ml)	2477,186 \pm 107,826	808,929 \pm 59,871
17β-estradiol (ng/ml)	13,019 \pm 0,830	2,505 \pm 0,180
Pregnandiol-3-glukuronid (ng/ml)	225,520 \pm 23,698	26,650 \pm 1,683

Vliv reprodukčních hormonů v moči na počet vyklíčených semen

V tabulce 9 jsou znázorněny korelace mezi naměřenými koncentracemi jednotlivých reprodukčních hormonů, estron sulfát, 17 β -estradiol, pregnandiol-3-glukuronid, a počtem vyklíčených semen na zředěné moči.

Tabulka 9: Korelace mezi naměřenými koncentracemi reprodukčních hormonů v moči jalovic a počtem vyklíčených semen

Test	Den	estron sulfát	17 β -estradiol	pregnandiol-3- glukuronid
		<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
Mungo fazole ředění 1:4	1	0,05	-0,107	0,061
	2	-0,207	-0,241*	-0,146
	3	-0,269*	-0,284*	-0,210
Mungo fazole ředění 1:14	1	0,086	-0,080	0,053
	2	-0,140	-0,321*	-0,227*
	3	-0,235*	-0,361*	-0,352*
Semena pšenice ředění 1:4	1	0,096	0,125	0,339*
	2	0,038	0,088	0,286*
	3	0,05	0,093	0,296*
Semena pšenice ředění 1:14	1	0,242*	0,416*	0,381*
	2	0,132	0,372*	0,251*
	3	0,043	0,294*	0,175

*statisticky významné korelace na hladině významnosti $p < 0,05$

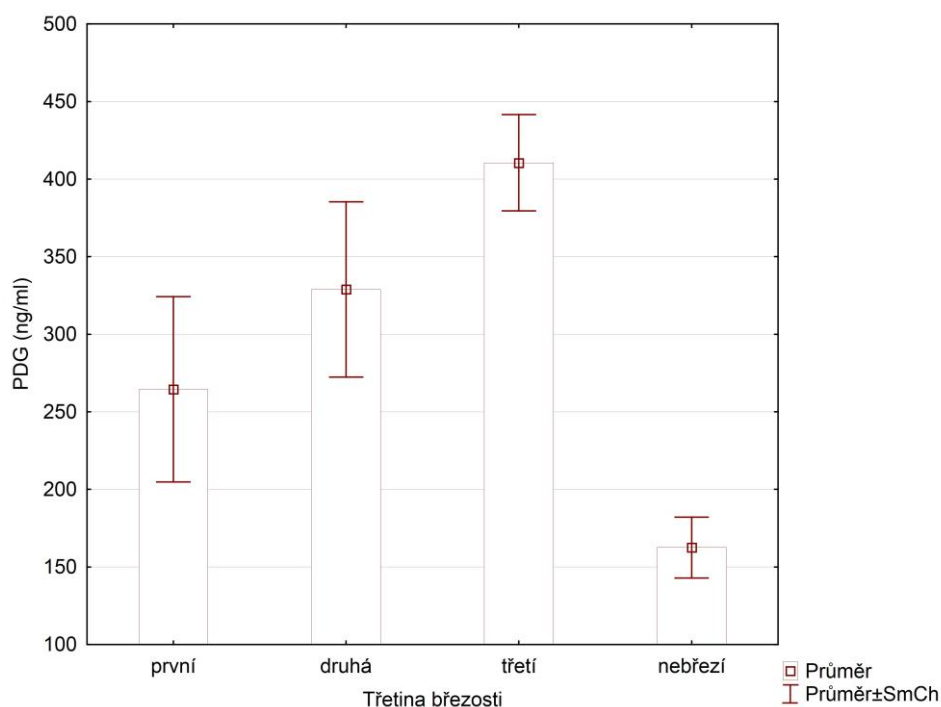
Vliv reprodukčních hormonů v moči na délku klíčků

Statisticky průkazná ($p < 0,05$) slabá negativní korelace byla potvrzena mezi délkou klíčků mungo fazolí a všemi třemi měřenými reprodukčními hormony, pro ředění 1:4 ($r = -0,235$, $r = -0,361$ a $r = -0,352$ pro E₁S, E₂ a PdG v uvedeném pořadí) a pro ředění 1:14 ($r = -0,190$, $r = -0,265$ a $r = -0,274$ pro E₁S, E₂ a PdG, v uvedeném pořadí).

V případě pšenice seté, které klíčila na moči zředěné v poměru 1:4, byla statisticky průkazná ($p < 0,05$) slabá pozitivní korelace mezi délkou klíčků a E_1S ($r = 0,086$) a také PdG ($r = 0,214$). U ředění 1:14 nebyla potvrzena žádná korelace mezi délkou klíčků pšenice seté a koncentrací reprodukčních hormonů v moči jalovic.

Celkem 12 vzorků moči bylo použito ke stanovení koncentrace E_1S a PdG březích a nebřezích lam alpak. Statisticky významně vyšší koncentrace E_1S ($p < 0,05$) byla naměřena v moči nebřezích samic oproti březím ($1784,54 \pm 253,36$ vs. $885,58 \pm 163,44$, v uvedeném pořadí). Žádné odlišnosti v koncentracích PdG v moči březích a nebřezích lam alpak prokázány nebyly ($p > 0,05$).

Pro stanovení PdG v moči oslic bylo analyzováno celkem 21 vzorků. Statisticky významně vyšší koncentrace PdG ($p = 0,009$) byla potvrzena v moči březích samic než těch nebřezích ($312,95 \pm 36,27$ vs. $162,51 \pm 19,67$, v uvedeném pořadí). Při rozdělení gestační periody oslic na třetiny byla statisticky významně potvrzena ($p < 0,05$) zvyšující se hladina PdG v moči s postupující březostí, jak je viditelné na obrázku 28.



Obrázek 28: Hladina PdG v moči březích oslic během první, druhé a třetí třetiny březosti v porovnání s nebřezími samicemi

Související publikace:

Kubátová A, Fedorova T, Skálová I, Hyniová L. 2016. Non-invasive pregnancy diagnosis from urine by the Cuboni reaction and the barium chloride test in donkeys (*Equus asinus*) and Alpacas (*Vicugna pacos*). Polish Journal of Veterinary Science 19: 477-484.

6.1.4 Test s chloridem barnatým

Výsledky testu s chloridem barnatým z první fáze výzkumu u jalovic českého strakatého skotu byly statisticky významně ovlivněny březostí jalovic českého strakatého skotu (Pearsonův chí-kvadrát: 28,2427, sv = 1, $p < 0,0001$). V moči březích jalovic nebyla ve většině případů detekována žádná reakce po přidání chloridu barnatého. Negativní reakce testu tedy skutečně označila samice jako březí z 79,7 %. Avšak v případě nebřezích jalovic byla spolehlivost testu v určení skutečného stavu jalovic jen 50 %. V druhé fázi výzkumu byl výsledek testu s chloridem barnatým významně ovlivněn (Pearsonův chí-kvadrát: 5,61430, sv = 1, $p = 0,018$) reprodukčním stavem jalovic. Negativní reakce moči po přidání 1% roztoku chloridu barnatého označila samici jako březí v 63,89 % případů. Naopak u nebřezích jalovic byla pozitivní reakce zaznamenána v 62,00 % vzorků. Statisticky významná souvislost ($p < 0,05$) byla prokázána mezi výsledky testu s chloridem barnatým z druhé fáze výzkumu a průměrnou hladinou hormonu PdG v moči všech testovaných jalovic. Výsledky ukázaly, že při průměrné hladině PdG v moči všech jalovic častěji nedocházelo k žádné reakci po přidání 1% roztoku chloridu barnatého do vzorku moči.

U lam alpak výsledky testu s chloridem barnatým také nebyly významně ovlivněny sezónností nebřezích samic ($p > 0,05$). Ani mezi výsledky tohoto testu a skutečným reprodukčním stavem samic alpak nebyl nalezen statisticky významný vztah ($p > 0,05$). Ve většině vzorků moči (92,86 %) lam alpak se neobjevila žádná reakce po přidání chloridu barnatého. Byly zaznamenány pouze 4 pozitivní reakce moči s chloridem barnatým, a to ve dvou vzorcích od březích samic a dvou vzorcích moči nebřezích.

Statisticky významných rozdílů ($p < 0,05$) mezi březími a nebřezími oslicemi bylo dosaženo v případě testu s chloridem barnatým. Jelikož sezónnost samic ovlivnila výsledky této reakce u nebřezích oslic ($p = 0,03$) byla spolehlivost testu s chloridem barnatým také vypočítána zvlášť pro každou sezónu. Z toho však vyplynulo, že výsledky u březích oslic v porovnání s těmi od nebřezích se statisticky významně nelišily během období jara a podzimu ($p > 0,05$). Nicméně významných výsledků bylo dosaženo v letní sezóně ($p < 0,01$),

kdy vzorky od březích samic (n=12) z 91,67 % nereagovaly na přídavek chloridu barnatého, kdežto ve vzorcích nebřezích samic (n=8) byla pozorována reakce v 87,50 %. Neprůkazných výsledků ($p > 0,05$) bylo dosaženo při rozdělení gestační periody oslic na poloviny a třetiny a jejich vzájemném porovnání a dále při jejich srovnání s výsledky testu od nebřezích samic.

Související publikace:

Skálová I, Fedorova T, Baranyiová E. 2017. Seed germination test as a potential pregnancy diagnosis method for domestic cattle. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 23: 453-461.

Skálová I, Kubátová A, Fedorova T. 2014. Non-Invasive Urine Sampling and Pregnancy Diagnosis in Domestic Cattle and Alpacas. Tielkes E editor. *Tropentag 2014: Bridging the gap between increasing knowledge and decreasing resources*. Prague. p218.

Skalova I, Fedorova T, Stolcova M, Kubatova A. 2017. Relationship between seed germination in diluted urine of heifers and urinary reproductive hormone profiles. *Indian Journal of Animal Research*. ODESLÁN.

6.1.5 Semikvantitativní analýzy moči

Ze subjektivního posouzení barvy moči autorkou a následného statistického zhodnocení vyplynulo, že tmavá moč se častěji vyskytovala u březích jalovic než u těch nebřezích ($p < 0,0001$). Přítomnost bílkovin a urobilinogenu byla také významně častěji detekována v moči březích samic ($p < 0,0001$). Statisticky významně vyšší pH moči indikováno papírky DUOTEST® bylo zjištěno u březích jalovic v porovnání s nebřezími ($8,90 \pm 0,02$ vs. $8,77 \pm 0,02$, v uvedeném pořadí). Specifická hmotnost stanovená diagnostickými proužky Dekaphan Leuco® byla vyšší ($p < 0,05$) v moči nebřezích jalovic než v moči těch březích ($1,003 \pm 0,0003$ vs. $1,002 \pm 0,0003$, v uvedeném pořadí). V případě přepočítané specifické hmotnosti moči nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi březími a nebřezími samicemi ($p = 0,8034$).

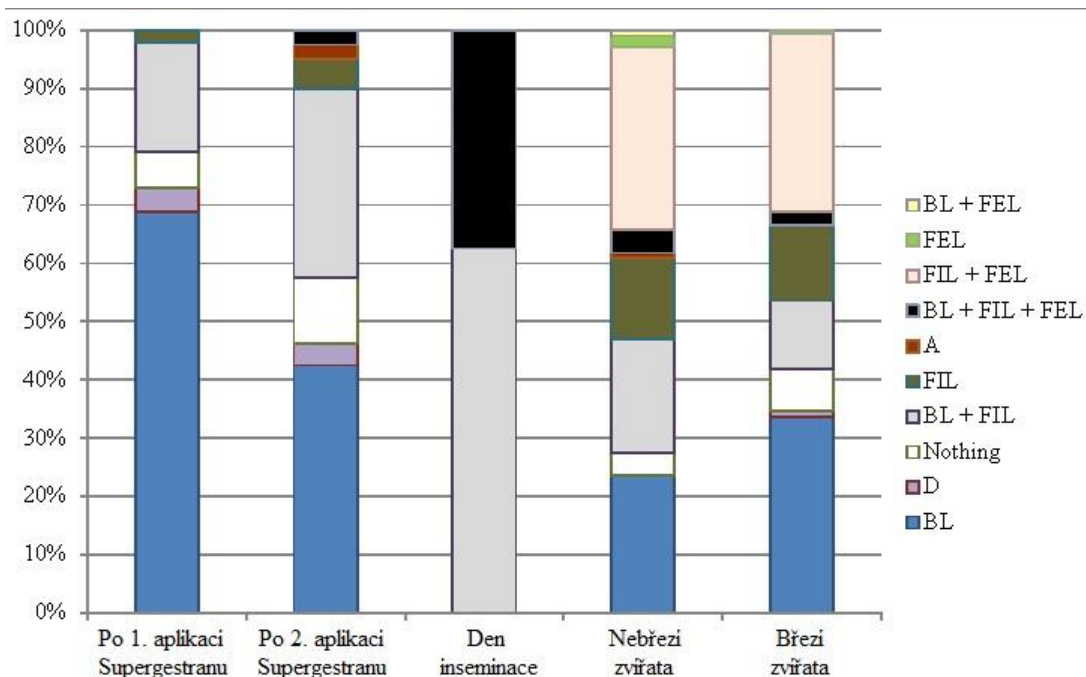
Třetí, čtvrtý a pátý den testu bylo klíčení mungo fazolí na zředěné moči 1:4 významně ovlivněno ($p < 0,05$; $p < 0,05$ a $p < 0,01$, v uvedeném pořadí) přítomností bílkovin v moči, a to tak, že vyšší počet vyklíčených semen mungo fazolí bylo zjištěno v moči, kde nebyla potvrzena přítomnost proteinů. Pátý den testu bylo na zředěné moči o koncentraci 1:14 bez přítomnosti bílkovin napočítáno statisticky významně více klíčků mungo fazolí ($p < 0,05$). Počet vyklíčených semen mungo fazolí byla také ovlivněn barvou moči. Statisticky více

semen klíčilo po celou dobu testu na světlé moči zředěné 1:14 i 1:14. Dále statisticky významně lepší klíčivost mungo fazolí po celou dobu testu byla pozorována na vzorcích moči zředěných 1:4 a bez detekovaného urobilinogenu ($p < 0,05$). Významně slabé negativní korelace (r od -0,34 do -0,24) byly zjištěny mezi počtem vyklíčených mungo fazolí a hodnotou pH stanovenou v moči pomocí papírků DUOTEST® po celou dobu testu, platné pro obě testované koncentrace. Dále významně slabé pozitivní korelace (r od 0,18 do 0,23) mezi třetím a pátým dnem testu byly stanoveny mezi počtem vyklíčených semen fazolí mungo a specifickou hmotností moči indikovanou proužky Dekaphan Leuco®.

Počet vyklíčených semen pšenice špaldy nebyl statisticky významně ($p > 0,05$) ovlivněn po celou dobu testu přítomností bílkovin, urobilinogenu v moči ani specifickou hmotností stanovenou proužky Dekaphan Leuco®. Oproti tomu mezi druhým a pátým dnem testu pšenice špalda klíčila významně lépe v počtu semen ($p < 0,01$) na světlé moči zředěné 1:4. Počet klíčků pšenice špaldy stanovený na moči o koncentraci 1:14 nebyl významně ovlivněn ($p > 0,05$) ani jedním ze zmíněných parametrů.

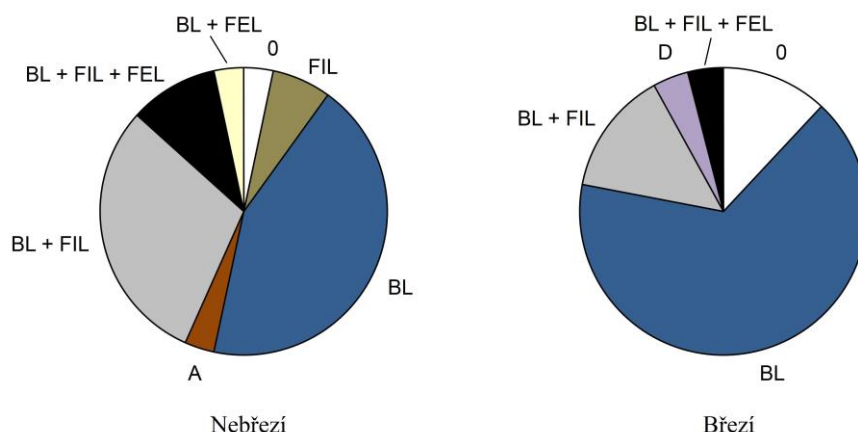
6.2 Krystalizace slin

Od Holštýnského skotu bylo odebráno celkem 408 vzorků slin. Ve všech vzorcích byla přítomna krystalizace a statisticky významně ($p < 0,00001$) byly potvrzeny změny v krystalizaci během různých reprodukčních fází. Výskyt typů krystalizace (%) ve slinách skotu je zobrazen na obrázku 29.



Obrázek 29: Výskyt typů krystalizace (%) ve slinách holštýnského skotu

V období 1-10, 11-19 a 30-24 dní po umělé inseminaci nebyl statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) v typu krystalů ve slinách březích a nebřezích krav. Z obrázku 30 je ale viditelné, že statisticky průkazný rozdíl ($p = 0,0410$) v typu krystalizace ve slinách březích a nebřezích samic skotu se objevil v období 20-29 dní po umělé inseminaci, kde žádná nebo větvičkovitá krystalizace spíše dominovaly ve slinách březích krav, zatímco jedlovitá, větvičko-jedlovitá a větvičko-jedlovito-kaprad'ovitá převažovaly ve slinách těch nebřezích.



Obrázek 30: Rozdíly v typu krystalizace mezi březími a nebřezími kravami v období 20-29 dní po inseminaci

V kombinaci s jinými typy krystalizace byly atypické krystaly pozorovány jak ve slinách březích, tak i nebřezích krav. Individuální výskyt atypické krystalizace ve slinách byl zaznamenán po druhé aplikaci synchronizačního preparátu, a to pouze u nebřezích krav. Atypická krystalizace se objevovala v několika formách, jak již bylo znázorněno na obrázku 20.

Pro hodnocení faktorů, jež mohou ovlivnit krystalizaci ve slinách byly provedeny celkem tři odběry samičích slin a tři odběry samčích slin, bylo hodnoceno 90 vzorků samičích slin a 90 vzorků samčích slin. Krystalizace byla pozorovatelná na 85 vzorcích se samičími slinami a 89 vzorcích se slinami samčími.

Vliv teploty při zasychání vzorků byl statisticky významný jak u slin samičích, tak i samčích ($p < 0,01$). Bylo prokázáno, že nižší teplota při zasychání způsobila u samic změnu z větvičko-jedlovitého typu krystalizace na převážně větvičkovitý typ ($\chi^2 = 10,04$; $sv = 2$; $p = 0,01$). U samců vyšší teplota při zasychání vzorků statisticky významně ovlivnila změnu typu krystalizace z větvičko-jedlovitého na jedlovitý ($\chi^2 = 13,73$; $sv = 2$; $p < 0,01$).

Změna koncentrace slin statisticky významně ovlivnila typ krystalizace ve vzorcích slin od samic, a to jak v případě ředění, kdy se typ krystalizace změnil z větvičko-jedlovité na větvičkovitou, tak i v přidavku soli, kde byla pozorována změna na kaprad'ovitou krystalizaci ($\chi^2 = 8,57$; $sv = 1$; $p < 0,01$ a $\chi^2 = 12,00$; $sv = 2$; $p < 0,01$, v uvedeném pořadí). Ve slinách samce nebyly pozorovány žádné změny v typu krystalizace vlivem úpravy koncentrace vzorku.

Související publikace:

Skalova I, Fedorova T, Brandlova K. 2013. Saliva crystallization in cattle: New possibility for early pregnancy diagnosis? *Agricultura Tropica et Subtropica* 46: 102-104.

Fedorova T, Brandlova K, Bičíková M, Skálová I, Lukešová D 2015. Salivary sex steroid hormones in female Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) during different reproductive stages. *Journal of Camel Practice and Research* 22: 61-66.

7 Diskuze

Stejně jako v obdobných studiích (Veena & Naredranath, 1993; Perumal 2014; Fedorova et al., 2015; Kubátová et al., 2016) byl odběr moči během spontánního močení vyhodnocen jako vhodný způsob, jak neinvazivně získat vzorek moči.

7.1 Test klíčivosti semen

Na rozdíl od metodiky uvedené ve studii od Perumala (2014) lze během testu klíčivosti, nechat semena klíčit přímo na zředěné moči v uzavíratelných Petriho miskách bez použití filtračního papíru.

Shodně se studií publikovanou Kubátovou a Fedorovou (2016) semena mungo fazolí klíčila lépe na moči o koncentraci 1:14.

V této disertační práci byl výsledek testu v první fázi výzkumu nejvíce patrný až na jeho konci, tj. pátý den. To je však v nesouladu se studií od Dilrukshi a Perrera (2009), kteří dosáhli výsledků testů klíčivosti semen dříve, již po dvou dnech pozorovali inhibované klíčení semen na moči od březích samic v porovnání s nebřezími a s využitím koncentrací 1:4 a 1:14. Stejných výsledků dosáhli i Rao Krishna a Veena (2009), kteří popsali lepší klíčivost fazolí mungo pod dvou dnech na moči od nebřezích samic, kterou zředili v poměru 1:4. V druhé fázi výzkumu u českého strakatého skotu bylo dosaženo výsledků testu klíčivosti semen z hlediska počtu semen již po třech dnech, což odpovídá studiím od Narayana Swamy et al. (2010), Rine et al. (2014) a Juodžentyté a Žilaitis (2016).

Zmíněné rozdíly by mohly být způsobené odlišnou fotoperiodou, zatímco na jihu Indie hodnota přesahuje 2100 hodin, v Praze se pohybuje okolo 1668 hodin (Osborn, 2016).

Výsledky testu klíčivosti semen pšenice špaldy na moči zředěné 1:4 jsou v souladu s těmi od Veena a Narendranath (1993), Krishna Rao a Veena (2009) a Rao Krishna a Veena (2009), kteří publikovali horší klíčivost pšenice po dvou dnech na moči březích samic. Avšak výsledky varianty s ředěním 1:14 odpovídají výsledkům, které publikovali Ghalioungui et al. (1963), s tím, že popsali zhoršenou nebo žádnou klíčivost semen pšenice, variet *baladi* a *hindi*, na moči od netěhotných žen. Stejně tak i výsledky testu klíčivosti pšenice seté z druhé fáze výzkumu u českého strakatého skotu odpovídají těm, kterých dosáhli zmiňovaní autoři. V případě zvířat je však trend opačný. Veena Ganesaiah (2006) uvedl inhibovanou klíčivost semen, která nechal klíčit na moči právě od březích samic pět dní.

Výsledky prezentované disertační práce ohledně délek klíčků mungo fazolí odpovídají závěrům od Dilrukshih a Perery (2009), kteří popsali potlačené klíčení semen po pěti dnech na moči od březích samic. Na druhé straně v jejich testu byly po pěti dnech naměřeny delší klíčky mungo fazolí než v této disertační práci. Tento rozdíl by mohl způsoben tím, že zmínění autoři aplikovali 15 ml roztoku moč: destilovaná voda pouze na 15 semen, zatímco v prezentované studii bylo aplikováno 20 ml tohoto roztoku na 50 semen. Dále by se mohl vzít v potaz fakt, že autoři Dilrukshi a Perera (2009) před začátkem testu klíčivosti nechali semena nasáknout v destilované vodě. V druhé fázi výzkumu u českého strakatého skotu bylo dosaženo výsledků testu klíčivosti semen, z hlediska měření délek klíčků fazolí mungo, již po třech dnech, což odpovídá studiím od Narayana Swamy et al. (2010), Rine et al. (2014) a Juodžentyté a Žilaitis (2016).

Získaná data z měření délek klíčků u pšenice špaldy i pšenice seté se liší od dostupných studií. Jak Veena a Narendranath (1993) tak i Veena Ganesiah (2006) publikovali významný inhibiční vliv březosti na délku klíčků pšenice, která klíčila na zředěné moči právě od březích samic. Je potřeba však zmínit, že uvedení autoři použili k testu lokální variety pšenice, které mohou mít odlišnou vzcházivost od námi dostupné pšenice špaldy a pšenice seté.

Z výsledků disertační práce lze usoudit, že mungo fazole mají lepší předpoklady pro využití v testu klíčivosti semen jako predikce březosti samic než semena pšenice špaldy nebo pšenice seté. Toto tvrzení může být podpořeno faktem, že luskoviny mají obecně lepší vzcházivost než obiloviny (Madamba et al., 2006). Dále můžeme vzít v potaz, že i teplota prostředí mohla ovlivnit rozdílné výsledky mezi mungo fazolemi a pšenicí špaldou. Khamassi et al. (2013) uvádí, že optimální teplota pro fazole se pohybuje okolo 20 °C, konkrétně však pro mungo fazole se uvádí rozmezí 27-30 °C (Madamba et al., 2006; DAFF, 2010). Zatímco Cramb et al. (2009) uvádí ideální teplotu pro růst pšenice 25 °C, Lee a Herbek (2009) uvádějí 12,5-25 °C jako adekvátní rozmezí teplot pro klíčení pšenice. Baskin a Baskin (2001) zmiňují, že nevhodná teplota může zpozdit klíčení. Madamba et al. (2006) dále popisují, že pšenice celkově špatně roste při vysokých teplotách se zvýšenou vlhkostí. Nejen vyšší teplota, ale i relativně vysoká vlhkost v uzavřených Petriho miskách mohla zapříčinit zhoršené klíčení pšenice ve srovnání s mungo fazolemi. Teplota by mohla být i činitelem rozdílných výsledků disertační práce a dalších výzkumů zaměřených na test klíčivosti semen s využitím pšenice. Většina studií byla prováděna v Indii, převážně na jihu Indie, kde se průměrná roční teplota pohybuje mezi 19-34 °C (Osborn, 2016). Průměrná teplota v laboratoři KCHZPT nebyla tak

vysoká a lze tedy předpokládat, že lokální variety pšenice z Indie nebo Egypta jsou vyšším teplotám lépe přizpůsobeny než variety dostupné v našem mírném pásmu.

Nehledě na to, že klíčení semen je ovlivněno hned několika faktory, například vlhkost, teplota, fotoperioda, výživa, skladování semen a rozdílné nároky jednotlivých druhů rostlin (White & Edwards, 2008), v prezentované disertační práci bylo aplikováno stejné množství roztoku (moč : destilovaná) na všechny typy semen. Zatímco mungo fazole spotřebovaly díky rychlému růstu všechny roztok v Petriho misce, semena pšenice byla po celou dobu testů (3 a 5 dní) ponořena ve zředěné moči. Navíc bylo u pšenice pozorováno ztmavnutí semen, barevné změny na semenech nebo se v Petriho miskách objevovala plíseň.

Výsledky testu klíčivosti semen pouze na destilované vodě (kontrolní varianty) jsou shodné se závěry autorů Veena a Narendranath (1993), Narayana Swamy et al. (2010) a Juodžentytė a Žilaitis (2016), kteří popsali lepší klíčivost semen na destilované vodě v porovnání s roztokem, který obsahoval moč zvířat.

Sundra et al. (2004) popsal pH moči přežvýkavců jako neutrální nebo slabě alkalické. Hodnota pH moči může být ovlivněna složením krmné dávky, infekcemi, dobou uchování nebo metabolickými či respiračními alkalózami (Bethard & Stokes, 2000; Sundra et al., 2004; Kume et al., 2011). V této disertační práci byly stanoveny celkově nižší hodnoty pH moči, u březích i nebřezích jalovic než ty, které uvádí Veena a Narendranath (1993), a to $7,38 \pm 0,40$ pro březí a $7,08 \pm 0,37$ pro nebřezí samice.

Dilrukshi a Perera (2009) ve své studii tvrdí, že pH moči není faktorem, který by mohl ovlivnit klíčivost semen na zředěné moči, neboť všechny jejich testované skupiny zvířat měly podobné hodnoty pH. Veena Ganesiah (2006) zmiňuje, že nižší pH moči zjištěné u březích zvířat může být díky vyšší koncentraci ABA v jejich moči. Optimální půdní pH pro růst pšenice je v rozmezí 5.5-6.0 (Fageria et al., 2010), zatímco u mungo fazole vyžadují pro svůj vývoj slabě zásadité pH, tedy 6,3-7,2 (DAFF, 2010). Jak uvádí Guo et al. (2009) klíčení pšenice může být negativně ovlivněno alkalickým stresem. Na základě zmíněných informací lze tedy předpokládat, že vyšší zásadité pH stanovené v moči jalovic českého strakatého skotu mohlo způsobit horší klíčivost pšenice špaldy ve srovnání s mungo fazolemi.

Hodnoty specifické hmotnosti indikované proužky Dekaphan Leuco® u březích i nebřezích jalovic odpovídaly těm fyziologickým, které uvádí Reece (2013) a Kim et al. (2010). Výsledky disertační práce sice ukázaly, že klíčivost semen na zředěné moči může být ovlivněna přítomností bílkovin v ní, nicméně jak zmiňuje Hofírek a Němeček (2009) i Sink a Weinstein (2012) moč zdravých zvířat by neměla obsahovat proteiny. ErbaGroup (2012) však

uvádí, že je možné indikačními papírky stanovit falešně pozitivní hodnoty bílkovin v moči v případě alkalického pH moči, které by bylo vyšší než 8.

7.2 Cuboniho reakce

Jak u jalovic českého strakatého skotu, tak u lam alpak lze říci, že Cuboniho reakce není vhodná metoda pro diagnostiku březosti. Vysokého počtu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků reakce dosáhl i Heller (1940) u prasat a O'Moore (1947) u skotu. Avšak u dalšího zástupce z čeledi velbloudovitých, velblouda dvouhrbého, byla metoda Cuboniho reakce k diagnostice březosti testována úspěšně (Fedorova et al., 2015). Tyto odlišné výsledky v rámci jedné čeledě lze vysvětlit možnou kontaminací vzorků moči lam alpak, která byla během odběrů moči zaznamenána. Během močení někdy docházelo k defekaci a exkrementy padaly přímo do plastového kelímku, do kterého byla moč zachytávána. Jelikož princip Cuboniho testu je založen na reakci volných estrogenů v moči samic a během posledního měsíce březosti lam dochází k výraznému nárůstu koncentrace právě estrogenů, tím tak mohlo dojít k vyšší četnosti falešně pozitivních výsledků (Bravo et al., 1996; Volkery et al., 2012). Avšak ve srovnání s oslicemi, vyšší koncentrace estrogenů v plazmě lam alpak v poslední fázi březosti nedosahuje tak vysoké úrovně jako u oslic (Aba et al., 1998; Meira et al., 1998), kde byla spolehlivost reakce 100 %, právě v pozdějším období gestace. Nelze tedy přesně vysvětlit, z jakého důvodu došlo k tak odlišným výsledkům Cuboniho reakce u lam alpak a oslic. U oslic se daly očekávat kladné výsledky z Cuboniho reakce díky jejich příbuznosti s koňmi (Groves & Grubb, 2011). Ve srovnání s výsledky testování Cuboniho reakce u dvouhrbých velbloudů má tento test v diagnostice březosti větší potenciál u oslic. U velbloudů Fedorova et al. (2015) dosáhli 100 % spolehlivosti v poslední třetině březosti, kdežto u oslic byla reakce 100 % spolehlivá během celé druhé poloviny gestační periody.

7.3 Hormonální analýzy

Výsledky koncentrací E2 v moči skotu odpovídaly závěrům studií, které se zaměřily na profily E2 v krevní plazmě a mléce (Robertson & King, 1979; Gaiani et al., 1982; Wendorf et al., 1983; Hung & Prakash, 1990; Patel et al., 1999; Hirako et al., 2003), a to tak, že koncentrace E2 v moči vzrůstala s postupující březostí a výsledkem byla vyšší koncentrace E2 u březích samic než u nebřezích.

I když u českého strakatého skotu i lam alpak byly výsledky koncentrací E1S v moči samic statisticky průkazné, bylo však zjištěno, že tyto rozdílnosti vykazují opačný trend. Zatímco zjištěná vyšší hladina E1S v moči březích jalovic koresponduje s výsledky od

Desaulnierse et al. (1989), Yanga et al. (2003) a Shaha et al. (2006), kteří popsali vzrůstající koncentraci E₁S v plazmě s postupující březostí, naměřené nižší hladiny E₁S v moči březích lam nejsou v souladu s tvrzením od Volkeryho et al. (2012). Bravo et al. (1996) dokonce popisují, že během březosti lam dosáhne koncentrace E₁S v moči dvou vrcholů. Do výzkumu k disertační práci byl však zahrnut malý počet vzorků k analyzování E₁S v moči lam alpak, a tak je možné připustit, že větší množství analyzovaných vzorků od početnější skupiny samic lam by mohlo ovlivnit budoucí výsledky. Autorka tedy nevyklučuje možnou diagnostiku březosti u lam využitím měření koncentrací E₁S v moči.

Dle získaných závěrů ze stanovení PdG v moči jalovic a výsledků studie Yanga et al. (2004) lze považovat monitoring PdG za metodu využitelnou v diagnostice březosti skotu. Yang et al. (2004) popisuje třikrát až čtyřikrát vyšší koncentraci PdG v moči krav 21 dní po umělé inseminaci ve srovnání s nebřezími. Avšak tyto hodnoty byly získány pouze od dvou samic. Data získaná výzkumem souvisejícím s disertační prací však mohou potvrdit značný rozdíl v koncentraci PdG v moči březích a nebřezích samic, bylo totiž stanoveno osminásobné množství PdG v moči jalovic březích 4-8 týdnů v porovnání s nebřezími jalovicemi. Při porovnání březích a nebřezích samic bizona amerického potvrdili také Kirkpatrick et al. (1991) a Kirkpatrick et al. (1992) vyšší koncentraci PdG v moči těch březích. V případě oslic byla také zaznamenána vzrůstající koncentrace PdG v moči s postupující březostí, což je v souladu se studií od Riada (1993), který stanovoval PdG v moči poníků a výsledky Kirkpatricka et al. (1990), kteří porovnávali koncentrace PdG v moči březích a nebřezích volně žijících koní. Naopak výsledky analýz PdG v moči lam alpak získané v této disertační práci nekorespondují s těmi, kterých dosáhli Volkery et al (2012). Testováním moči od lam alpak totiž zjistili výrazně vyšší koncentrace PdG v moči březích alpak oproti nebřezím. Neprůkazné rozdíly v koncentraci PdG v moči lam publikované v této studii mohly být způsobeny malým počtem analyzovaných vzorků, protože zatímco autorka pracovala s 12 vzorky, tak Volkery et al. (2012) analyzovali 13 vzorků moči nebřezích alpak a 25 vzorků moči březích. Volkery et al. (2010) dokonce uvádějí, že měření koncentrace PdG v moči lam je vhodnou alternativou pro detekci ranou detekci u těchto zvířat. Vyšší hladinu PdG oproti nebřezím samicím mají březí lamy již v prvním měsíci gestační periody a v tomto období ještě nelze využít trans-abdominální sonografii. Autorka nepřipouští možný vliv odlišně zvoleného typu komerčního kytu oproti jiným studiím zabývajících se analyzováním PdG v moči lam (Bravo et al., 1992; Volkery et al., 2010; Volkery et al., 2012) neboť u ostatních skupin testovaných zvířat ve vlastní studii byly výsledky získané PdG analýzou průkazné.

Obvykle je společně s hormony v moči stanovován kreatinin, vůči kterému jsou následně koncentrace hormonů přepočítávány (Kirkpatrick et al., 1991; Yang et al., 2003). Avšak k účelům této disertační práce nebylo nutné stanovit hladinu kreatininu a následné přepočítání koncentrací hormonů, neboť konkrétní profily reprodukčních hormonů byly využity k otestování jejich možného vlivu na klíčivost semen na zředěné moči.

Oproti výsledkům studie od Nirmaly et al. (2008) byly zjištěny korelace mezi reprodukčními hormony v moči a klíčivostí semen. Konkrétně hladiny E2 a PdG v moči jalovic korelovaly s klíčivostí více než E₁S. Nirmala et al. (2008) zamítli možné ovlivnění klíčivosti hormony E2 a E₁S. PdG nebylo v tomto směru nikdy otestováno, tudíž jeho vliv na klíčivost semen na zředěné moči nebyl potvrzen ani vyvrácen. Na základě prezentované disertační práce lze předpokládat, že fazole mungo měly se vzrůstající hladinou PdG v moči potlačenou klíčivost, naopak pšenice setá s vyšší koncentrací PdG klíčila lépe. Avšak v případě pšenice seté byl vliv stavu březosti na klíčivost potvrzen pouze u varianty s ředěním 1:14. Tato skutečnost koresponduje s výsledky studie publikované Kubátovou a Fedorovou (2016), kde využily mungo fazole.

Přestože některé studie zmiňují, že vyšší hladina ABA v moči březích samic může inhibovat klíčení semen na zředěné moči (Dilrukshi & Perera, 2009; Veena Ganesaiah, 2006), porovnání výsledků testu klíčivosti mungo fazolí a pšenice v této disertační práci vykazuje jisté odlišnosti. I když autorka souhlasí s tvrzením Raa Krishny a Veeny (2009), že rostlinné růstové regulátory jako auxiny nebo ABA mohou být vyměšovány močí ve vyšších koncentracích, v případě, že krmná dávka zvířete obsahuje tyto růstové regulátory ve vyšším množství, předpokládá, že spíše vyšší hladina PdG v moči březích samic je tím inhibičním faktorem pro klíčivost semen na zředěné moči.

7.4 Test s chloridem barnatým

I když test s chloridem barnatým má dle výsledků jistý potenciál, při označení nebřezích samic je však spolehlivost testu diskutabilní. V managementu chovu hospodářských zvířat je zásadní detekovat nezabřezlé samice, neboť to chovateli umožní brzký pokus o nové připuštění, snížení nákladů na výživu jalových samic, zabránění přestárnutí samic, které již dosáhly chovatelské dospělosti nebo případné zkrácení doby stání na sucho u dojnic (Bouška et al., 2006). Metabolizovaný progesteron je vylučován močí ve formě PdG. Přítomnost PdG v moči březích i nebřezích samic byla potvrzena u několika druhů sudokopytníků (Loskutoff et al., 1983). V moči březích samic se pak PdG vyskytuje ve vyšších koncentracích

(Kirkpatrick et al., 1991; Kirkpatrick et al., 1992; Yang et al., 2004), což bylo potvrzeno i prezentovanou disertační prací. Z těchto informací lze usoudit, že i průměrná hladina PdG v moči mohla zapříčinit diskutabilní výsledky testu s chloridem barnatým. V druhé fázi výzkumu u jalovic českého strakatého skotu bylo sice dosaženo lepších výsledků v určení nebřezích jalovic pomocí tohoto testu než v první fázi, ale je nutné zmínit, že v druhé fázi bylo odebráno výrazně méně vzorků moči i od menšího počtu zvířat. Z tohoto důvodu autorka považuje tento test za nespolehlivý zvláště při rozpoznání nezabřezlých jalovic.

Ani u lam alpak nelze použít k diagnostice březosti využít test s chloridem barnatým. Stejných výsledků dosáhli i Fedorova et al. (2015) u velbloudů dvouhrbých a Krishna Rao a Veena (2009) u skotu. I v případě oslic je využití testu s chloridem barnatým k detekci březosti sporné, díky tomu, že sezónnost ovlivnila jeho výsledky u nebřezích samic. Signifikantních výsledků bylo sice dosaženo v letním období, ale tyto výsledky nekorespondují s těmi, kterých dosáhli Ndu et al. (2000a, b) nebo Lalrintluanga a Dutta (2009). Navíc Galisteo a Perez-Marin (2010) uvádějí, že hlavní reprodukční sezóna probíhá u oslů během jara.

7.5 Krystalizace slin

Odběr vzorků slin buď pomocí jednorázového plastového kávového míchátko nebo plastové lžice je velmi jednoduchý, ale je zde riziko zničení odběrového materiálu a následné spolknutí kousků plastů zvířetem. Autorka disertační práce tedy doporučuje šetrnou manipulaci s plastovým materiálem a odběr slin provádět lehkým setřením z vnitřku dutiny ústní zvířete nebo využít sběr odkapávajících slin z jejího okraje. Jako nevhodný způsob, jak získat sliny autorka disertační práce považuje metodu prezentovanou autorem Pardo-Carmona (2010), který odebíral vzorky slin obtiskem podložního sklíčka na jazyk fen, neboť je zde riziko rozlomení podložního sklíčka a poranění dutiny ústní nebo polknutí střepů zvířetem.

Ohledně typu krystalizace ve slinách holštýnského skotu byly pozorovány určité podobnosti s krystalickými útvary pozorovanými např. ve slinách fen (Pardo-Carmona, 2010), cervikálním hlenu skotu (Noonan et al., 1975) nebo ženském cervikálním hlenu (Zondek & Rozin, 1954). Atypickou krystalizaci také popsali Rob a Stehlík (1983). Některé z atypických krystalů popsaných v této disertační práci se shodovaly s těmi, které Rob a Stehlík (1983) pozorovali v cervikálním hlenu skotu během metabolických poruch nebo zánětlivých procesů. Autorka disertační práce předpokládá, že výskyt atypických krystalických útvarů ve slinách holštýnského skotu mohl být způsoben kontaminací vzorku nebo např. metabolickou poruchou, o které však autorka nebyla informována. Výskyt jednotlivých typů krystalizace ve

slinách byl porovnáván pouze se studii zaměřenými na pozorování krystalů ve slinách zvířat. Velká podobnost byla nalezena ve studii od Haberové (2010) zaměřená na velbloudy, kde byly pozorovány všechny typy krystalizace, ale nejčastěji se vyskytujícím typem byla také větvičkovitá krystalizace.

Murray et al. (2000) popisuje vliv gestagenů na snížení periferního průtoku krve. Tím dochází ke snižování tepelných ztrát a tělesná teplota má tendence se zvyšovat během luteální fáze. Nárůst bazální teploty s blížící se říjí může vysvětlovat pozitivní vliv vyšší teploty při zasychání vzorků samičích slin na rozvíjející se krystalizaci, neboť působením vyšší teploty při zasychání došlo k přeměně větvičkovitého typu krystalizace na rozvinutější. V cervikálním hlenu je možné v období říje pozorovat krystaly, které připomínají list kapradiny (Cortés et al., 2014; Bernardi et al., 2016). Právě kapradovitá krystalizace je v mnoha studiích považována za nejrozvinutější typ (Alliston et al., 1958; Pattanasuttinont et al., 2007). Na základě zmíněných skutečností autorka doporučuje při dalším testování krystalizace slin provádět přípravu vzorků standardním způsobem, tím, že se vzorky slin nechají zasychat při stálé pokojové teplotě.

Zondek (1959) uvádí, že krystalizace vzniká v roztocích bílkovin a sacharidů. Zondek (1959) dále zmiňuje, že krystaly jsou až z 97 % tvořeny z chloridu sodného (NaCl). K tvorbě krystalických útvarů je nutná přítomnost sodíkových (Na) a draslíkových (K) iontů. Devi et al. (2016) publikovali výrazně vyšší koncentrace Na a K ve slinách během říje buvolů oproti ostatním fázím estrálního cyklu. Jádra krystalů tvoří proteinové molekuly, které vážou molekuly vody se solemi (Na a K). Soli vytvářejí krystalky v proteinových molekulách, a tak vznikají útvary známe jako krystalizace tělních tekutin (Cortés et al., 2014). Tato tvrzení tak mohou podpořit výsledky prezentované disertační práce, kde rozvinutější typ krystalizace vznikal ve více koncentrovaných vzorcích slin a při naředění samičích slin došlo k degradaci v typu krystalických útvarů. Přídavek soli do vzorku slin zapříčinil rozvinutí vyššího stupně krystalizace. Jak již bylo zmíněno, k tvorbě krystalů je zapotřebí přítomnosti sodíkových a draslíkových iontů (Cortés et al., 2014). Alagendran et al. (2007) ve své studii uvádí, že působením estrogenů vzrůstá hladina draslíkových iontů v těle samic. Linford (1974) popsal nejvíce rozvinutou krystalizaci během vyšší koncentrace estrogenů. Tyto poznatky by tak mohly vysvětlovat negativní ovlivnění typu krystalizace změnou koncentrace vzorku samičích slin jež bylo zjištěno v prezentované disertační práci. Nízká koncentrace krystaly vytvářejících iontů nemohla být v případě samce kompenzována vlivem estrogenů, neboť jak je obecně známo, jejich hladina u sameců v porovnání se samicemi nedosahuje takové úrovně.

8 Závěr

Výsledky testu klíčivosti ukázaly jistý potenciál. Byly prokázány rozdíly v klíčivosti semen na zředěné moči březích a nebřezích jalovic českého strakatého skotu. Závěry první fáze výzkumu ukázaly, že test klíčivosti semen s využitím mungo fazolí lze aplikovat během 101.-150. dne březosti jalovic, bez ohledu na to, jakou koncentraci roztoku moč : destilovaná voda zvolíme. Moč březích jalovic inhibovala klíčení mungo fazolí od třetího do pátého dne testu klíčivosti. Potlačený růst klíčků na moči březích jalovic byl zaznamenán pouze u fazolí mungo. Semena pšenice špaldy mohou být k testu klíčivosti použita jen v případě, že moč samic bude zředěna destilovanou vodou v poměru 1:4. Výsledky druhé fáze výzkumu potvrdily inhibiční vliv moči březích jalovic na klíčivost mungo fazolí. U všech variant testu klíčivosti byl zaznamenán negativní vliv roztoku moč : destilovaná voda na klíčení semen v porovnání s kontrolními variantami, které obsahovaly pouze destilovanou vodu. Na základě těchto závěrů lze usoudit, že vyhodnocení klíčivosti a měření délek klíčků fazolí mungo vyklíčených na zředěné moči by mohlo posloužit jako levná a technologicky nenáročná orientační diagnostická metoda využitelná v malochovech hospodářských zvířat.

Cuboniho reakce byla vyhodnocena jako nevhodná pro diagnostiku březosti u jalovic českého strakatého skotu a lam alpak, neboť výsledky Cuboniho reakce neodpovídaly skutečnému reprodukčnímu stavu samic u obou druhů sudokopytníků. Naopak u oslic má využití Cuboniho reakce k detekci březosti velký potenciál, protože ve druhé polovině březosti oslic označila Cuboniho reakce samice jako březí se 100% spolehlivostí.

V moči březích jalovic českého strakatého skotu byla potvrzena vyšší koncentrace všech tří stanovovaných reprodukčních hormonů oproti nebřezím. Autorka však preferuje využití pregnandiolu-3-glukuronidu k časně diagnostice březosti u jalovic domácího skotu. V případě lam alpak se podařilo zanalyzovat koncentraci estron sulfátu a pregnandiolu-3-glukuronidu. Významných výsledků bylo dosaženo jen u estron sulfátu, kdy vyšší hladina tohoto hormonu byla naměřena v moči březích samic lam alpak. U oslic byl v moči stanovován pregnandiol-3-glukuronid a vyšší koncentrace byly zjištěny u březích samic.

Souvislost mezi koncentracemi reprodukčních hormonů v moči jalovic a výsledky testu klíčivosti semen byla potvrzena negativními a pozitivními korelacemi. Zvláště pak u mungo fazolí byla zaznamenána inhibovaná klíčivost vlivem vyšších hladin estrogenů a pregnandiolu-3-glukuronidu.

Diagnostikování březosti u sledovaných druhů pomocí testu s chloridem barnatým nepřineslo uspokojivé výsledky. I když v případě lam alpak ukázal tento test jistý potenciál, byl autorkou disertační práce vyhodnocen jako nespolehlivý, a tedy nevhodná technika pro rozlišení březích a nebřezích jalovic domácího skotu, lam alpak a oslic.

Z výsledků semikvantitativních analýz moči vyplynulo, že světlá moč byla častěji detekována u nebřezích jalovic než u březích, stejně jako negativní hodnoty bílkovin a normální hodnoty urobilinogenu v moči. Při testování souvislosti mezi semikvantitativními analýzami a klíčivostí semen bylo prokázáno, že více fazolí mungo vyklíčilo na moči bez přítomnosti bílkovin a fyziologickými hodnotami urobilinogenu.

Krystalické útvary byly pozorovány jak ve slinách domácího skotu, přesněji u krav holštýnského plemene, tak ve slinách velblouda dvouhrbého. Ve slinách skotu byly detekovány všechny typy krystalizace, které byly zařazeny do hodnotícího schématu. Dále byly u krav potvrzeny změny v typu krystalizace během různých fází reprodukčního cyklu. Teplota při zasychání a změna koncentrace slin jsou faktory, které mohou zapříčinit změny krystalických útvarů již při přípravě vzorků a ovlivnit tak výsledky vyhodnocování fenoménu krystalizace.

Testované neinvazivní metody ukázaly jistý potenciál v rozlišování březích a nebřezích samic kopytníků, ale jen některé z nich jsou spolehlivě aplikovatelné v praxi. Test klíčivosti semen by mohl být využit pro orientační diagnostiku březosti skotu v oblastech, kde nejsou dostupné moderní technologie nebo chybí finanční prostředky. Avšak největší přínos práce autorka vidí ve využití měření koncentrací PdG v moči samic skotu k diagnostice březosti a dále pak zavedení Cuboniho reakce do praxe jako nové metody použitelné pro detekci březích oslic.

Při vyhodnocování krystalizace slin je třeba vzít v potaz, že teplota při zasychání nebo změna koncentrace vzorků jsou faktory, které mohou zapříčinit zkreslené výsledky hodnocení krystalizace již během přípravy vzorků.

9 Seznam použité literatury

- Aba MA, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J, Edqvist LE. 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta veterinaria Scandinavica* 36: 489-498.
- Abdalla O. (1965). Anatomical study of the female genital system of the one-humped camel. I. Ovaries. *Sudan J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 6, 41-52. IN: *Reproduction in camels: A review.* FAO Animal Reproduction and Health Paper. Merkt H., Rath D., Musa B., El-Naggar M.A. eds. 1990. 82. 54pp.
- Abdalla O. (1967). Anatomical study of the female genital system of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). II. The oviducts. *Sudan J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 8, 67-77.
- Abraham GE. 1975. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *Journal of Steroid Biochemistry* 6: 261-270.
- Ahmadi MR, Kafi M, Ghodrat M. 2005. Crystallization and the number of neutrophils increase in the cervical mucus as parturition approaches in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology* 14: 72-75.
- Alagendran S, Archunan G, Achiraman SS. 2007. Prediction of Ovulation in Women through the Occurrence of Salivary Fern Prototype. *The IUP Journal of Life Sciences IJLS*10708.
- Alliston CW, Patterson TB, Ulberg LC. 1958. Crystallization patterns of cervical mucus as related to estrus in beef cattle. *Journal of Animal Science* 17: 322-325.
- Amer AH, Shawki G, Ismail R. 2008. Profile of steroid hormones during oestrus and early pregnancy in arabian mares. *Slovenian Veterinary Research* 45: 25-32.
- Anderson K. 2013. Mare reproduction. Extension: Issues, Inovation, Impact. Available at <http://articles.extension.org/pages/10248/mare-reproduction>: Accessed 2017-05-15.
- Anderson LL, Perezgrovas R, O'Byren, Steinetz BG. 1982. Biological actions of relaxin in pigs and beef cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 380:131-150.
- Australian Alpaca Association (AAA). Alpaca Fact Sheet #3. Parturition (Birth). AAA Inc. Education & Training Sub-committee. 2p.
- Ball PJH, Peters AR. 2004. *Reproduction in cattle.* Oxford: Blackwell Publishing. 248p.
- Bamberg E, Möstl E, Patzl M, King GJ. 1991. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22: 73-77.
- Banerjee S. 1974. Comparative efficiency of different diagnostic techniques for pregnancy in camels (*Camelus dromedarius*). [MVSc.]. Udaipur: University of Udaipur.

- Barbato M, Pandolfi A, Guida M. 1993. A new diagnostic aid for natural family planning. *Advances in Contraception* 9: 335-340.
- Baska-Vincze B, Baska F, Szenci O. 2014. Transabdominal ultrasonographic evaluation of fetal well-being in the late-term mare and cow. *Acta Veterinaria Hungarica* 62: 439-451.
- Baskin CC, Baskin JM. 2001. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and evolution*. San Diego: Academic Press. 666p.
- Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction* 56:133-142.
- Bernardi S, Rinaudo A, Marini P. 2016. Cervical mucus characteristics and hormonal status at insemination of Holstein cows. *Iranian Journal of Veterinary Research* 17: 45-49.
- Bethard G, Stokes S. 2000. *Managing transition cows for better health and production*. Oregon State University: Corvallis. 8p.
- Boeta M, Zarco L. 2005. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 25: 531-538.
- Bouška J., Doležal O., Jílek F., Kudrna V., Kvapilík J., Příbyl J., Rajmon R., Sedmíková M., Skřivanová V., Šlosárková S., Tyrolová Y., Vacek M., Žižlavský J. 2006. *Chov dojného skotu*. Praha: Profi Press. 186 p.
- Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BI. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology of Reproduction* 43: 579-585.
- Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BI. 1992. Pituitary response to repeated copulation and/ or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biology of Reproduction* 47: 884-888.
- Brooks RV, Firth RG, Summer NA. 1975. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *British Journal of Sports Medicine* 9: 89-92.
- Buckrell BC, Bonnett BN, Johnson WH. 1986. The use of real-time ultrasound rectally for early pregnancy diagnosis in sheep. *Theriogenology* 25: 665-673.
- Bulman DC, Lamming GE. 1978. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 447-458.
- Burdych V, Všetečka J, Brychta J, Stejskalová E, Divoký L. 2004. *Reprodukce ve stádech skotu*. Hradec Králové: CHOVSERVIS a.s. 71p.

- Camel Reproduction Centre Dubai, UAE (2017). Available at <http://www.uaeinteract.com/news/default3.asp?ID=363>: Accessed 2017-07-23.
- Camelid Veterinary Services Ltd. 2017. The Old Barracks, Lady Grove, Goring Heath, Reading, RG8 7RU. Available at <http://www.ukalpacavet.com/>: Accessed 2017-07-23.
- Cebra CK, Watrous BJ, Cebra ML. 2002. Transabdominal ultrasonographic appearance of the gastrointestinal viscera of healthy llamas and alpacas. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 43: 359-366.
- Clayton HM, Lindsay FEF, Forbes AC, Hay LA. 1981. Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. *Applied Animal Ethology* 7: 169-174.
- Cole HH, Cupps PT. 1969. *Reproduction in domestic animals*. New York: Academic Press. 684p.
- Cortés ME, González F, Vigil P. 2014. Crystallization of bovine cervical mucus at oestrus: An update. *Revue de Médecine Vétérinaire* 28: 103-116.
- Cowie AT. 1948. *Pregnancy diagnosis tests: a review*. Edinburgh: Commonwealth Agricultural Bureau of Animal Breeding and Genetics. 283p.
- Cox J, Galina C. 1970. A comparison of the chemical test for oestrogens used in equine pregnancy diagnosis. *Veterinary Record* 86: 97-99.
- Cramb J, Perry MW, McKeague S, Mulcaby MJ. 2000. *Environment*. Anderson WK, Garlinge JR editors. The wheat book: principles and practice. Western Australia: Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Pretoria. 16p.
- Crisci A, Rota A, Panzani D, Sgorbini M, Ousey JC, Camillo F. 2014. Clinical, ultrasonographic, and endocrinological studies on donkey pregnancy. *Theriogenology* 81: 275-283.
- Crowe MA, Padmanabhan V, Mihm M, Beitins IZ, Roche F. 1998. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulation hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biology and Reproduction* 58:1445-1450.
- Cupps PT, Briggs JR, Hintz HF, Heitman Jr. H. 1966. Pregnancy diagnosis in the sow. *Journal of Animal Science* 25: 646-647.
- Czekala NM, Callison L. 1996. Pregnancy Diagnosis in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) by Salivary Hormone Analysis. *Zoo Biology* 15: 37-44.
- Čadová K. 2013. Kubátová A, editor. *Osobní sdělení*. Státní Veterinární Institut Praha.
- De Kruif A. 1978. Factors influencing the fertility of a cattle population. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 507-518.

- Dehnhard M, Kumar V, Chandrasekhar M, Jewgenow K, Umapathy G. 2015. Non-invasive pregnancy diagnosis in big cats using the PGFM (13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}) assay. PLoS ONE 10(12): e0143958.
- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries (DAFF). 2010. Mung bean production guideline. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Pretoria. 16p.
- Desaulniers DM, Goff AK, Betteridge KJ, Rowell JE, Flood PF. 1989. Reproductive hormone concentrations in faeces during the oestrous cycle and pregnancy in cattle (*Bos taurus*) and muskoxen (*Ovibos moschatus*). Canadian Journal of Zoology 67: 1148-1154.
- Devi I, Singh P, Lathwal SS, Kumaresan A, Dudi K. 2016. Evaluation of salivary electrolytes during estrous cycle in Murrah buffaloes with reference to estrus detection. Veterinary World 9: 1157-1161.
- Dilrukshi HNN, Perera ANF. 2009. Evaluation of an ancient technique to diagnose the pregnancy in cattle using urine. Wayamba Journal of Animal Science 1: 6-8.
- Diskin MG, Sreenan JM. 2000. Expression and detection of oestrus in cattle. Reproduction Nutrition Development 40: 481-491.
- Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. Journal of Reproduction and Fertility 120:405-410.
- Domènech A, Pich S, Arís A, Plasencia C, Bach A, Serrano A. 2011. Heat identification by 17β-estradiol and progesterone quantification in individual raw milk samples by enzyme immunoassay. Electronic Journal of Biotechnology 14. Available at <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue4-fulltext-6>: Accessed 2017-04-10.
- England G. 2008. Fertility and Obstetrics in the Horse. John Wiley & Sons, Inc. 320p.
- Engvall E. 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods of Enzymology 70: 419-439.
- ErbaGroup. 2014. Diagnostické proužky PHAN. Available at <https://www.erbalachema.com/produkty-a-reseni/mocova-analyza/diagnostickeprouzky-phan/>: Accessed 2014-03-15.
- Fageria NK, Baligar VC, Jones CA. 2010. Growth and mineral nutrition of field crops. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group. 586p.
- Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze. 2014. Pravidla citování Fakulty tropického zemědělství ČZU v Praze pro psaní textů v češtině. Available at file:///C:/Users/ivask/Downloads/pravidla-citovani-ftz-cj-2014.pdf : Accessed: 2017-01-05. 18p.

- Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze. 2016. Metodický manuál pro psaní DP. Available at <file:///C:/Users/ivask/Downloads/fta-thesismanual-2016-.pdf>: Accessed 2017-01-10. 17p.
- FAO. 2017. A manual for primary animal health care worker. Chapter 7: Camels, llamas and alpacas. Available at <http://www.fao.org/docrep/t0690e/t0690e09.htm>: Accessed 05-29-2017.
- Fedorova T, Brandlová K, Lukešová D. 2015. Application of non-invasive pregnancy diagnosis in Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) using Cuboni reaction and barium chloride test. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 46: 355-358.
- Foot RH. 1974. Estrus detection and estrus detection aids. *Journal of Dairy Science* 58:248-256.
- Ford JJ, D'occhio MJ. 1989. Differentiation of sexual behavior in cattle, sheep and swine. *Journal of Animal Science* 67:1816-1823.
- Fowler ME. 2011. *Medicine and Surgery of Camelids*. John Wiley & Sons. 636p.
- Gaiani RM, Mattioli G, Galeati G, Chiesa F. 1982. The relationship between oestrone and oestrone sulphate in the plasma and milk of the cow during pregnancy. *Archivio Veterinario Italiano* 33: 86-91.
- Galisteo J, Perez-Marin CC. 2010. Factors affecting gestation length and estrus cycle characteristics in Spanish donkey breeds reared in southern Spain. *Theriogenology* 74: 443-450.
- Garshelis DL. 2006. On the Allure of Noninvasive genetic sampling: putting a face to the name. *Ursus* 17: 109-123.
- Ghalioungui P, Khalil SH, Ammar AR. 1963. On an ancient Egyptian method of diagnosing pregnancy and determining foetal sex. *Medical History* 7: 241-246.
- Gleixner A, Meyer HHD. 1997. Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357: 1198-1201.
- Gradela A, Esper CR, Rosa e Silva AAM. 1996. Plasma concentrations of progesterone, 17 β -estradiol and androstenedione and superovulatory response of Nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. *Theriogenology* 45: 843-850.
- Groves C, Grubb P. 2011. *Ungulate taxonomy*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 322p.
- Guida M, Tommaselli GA, Palomba S, Pellicano M, Moccia G, Di Carlo C, Nappi C. 1999. Efficacy of methods for determining ovulation in a natural family planning program. *Fertility and Sterility* 72: 900-904.

- Gündoğan M. 2009. Ovulatory follicle size and mucus ferning level in relation to non-return rate during artificial insemination time in spontaneously oestrus signed cows. *Fýrat Üniversitesi Sađlýk Bilimleri Veteriner Dergisi* 23:9-13.
- Gunther JD, Foley CW, Gaverick HA, Plotka ED. 1980. Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *Journal of Animal Science* 51: 1131-1138.
- Guo R, Shi L, Yang Y. 2009. Germiantion, growth, osmotic adjustment and ionic balance of wheat in response to saline and alkaline stresses. *Soil Science and Plant Nutrition* 55: 667-679.
- Haberová T, Koláčková K, Lukešová D. 2011. Pregnancy Diagnosis by Chemical Tests of Urine in Camels (*Camelus bactrianus*). Schumann A, Seet S, Jewgenow K, Hofer H editors. 8th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife. Berlin. p76.
- Haberová T, Skálová I, Brandlová K, Kajzrová S, Lukešová D. 2012. The usage of disposable catering supplies for sampling of saliva and urine in even-toed ungulates. Fernández Cusimami E, Banout J editors. 6th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics. Sustainable Use of Natural Resources in Tropics and Subtropics. Prague: Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences Prague. p51.
- Haberová T. 2010. A Preliminary Study of Saliva Crystallization in Bactrian Camels (*Camelus bactrianus*). Fernández Cusimami E, Havrland B editors. 4th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics. Sustainable Use of Natural Resources in Tropics and Subtropics. Prague: Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences Prague. p28.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 509p.
- Hagstrom DJ. 2004. Donkeys are different: An overview of reproductive variations from horses. Illinois: University of Illinois Extension. 5p.
- Hayes CMH. 2002. *Veterinary notes for horse owners: New revised edition of the standard work for more than 100 years*. New York: Simon and Schuster. 880p.
- Heistermann M, Trohorsch B, Hodges JK. 1997. Assessment of Ovarian Function in the African Elephant (*Loxodonta africana*) by Measurement of 5 α -Reduced Progesterone Metabolites in Serum and Urine. *Zoo Biology* 16: 273-284.
- Heller H. 1940. Experiments with the Cuboni test for pregnancy diagnosis in the pig [PhD thesis] Wien: Universität Wien.

- Henry M, Lodi LD, Gastal MMFO. 1998. Sexual behaviour of domesticated donkeys (*Equus asinus*) breeding under controlled or free range management systems. *Applied Animal Behaviour Science* 60: 263-276.
- Henry M, McDonnell SM, Lodi LD, Gastal EL. 1991. Pature mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced estrus. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 44: 77-86.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction* 66: 6-13.
- Hindle JE, Möstl E, Hodges JK. 1992. Measurement of urinary oestrogens and 20 α -dihydroprogesterone during ovarian cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. *Journal of Reproduction Fertility* 94: 237-249.
- Hirako M, Takahashi T, Takahashi H, Patel OV, DOMEKI I. 2003. Changes in plasma estrogen concentrations during the first trimester of gestation in dairy cows: comparison with the origin of embryos and fetal number. *Japan Agricultural Research Quarterly* 37: 195-200.
- Hoard's Dairyman. 1996. Dairy Cattle Fertility & Sterility. Milwaukee: Hoard's Dairyman Books. W.D. Hoard & Sons Company. 80p.
- Hodges K, Brown J, Heistermann M. 2010. Endocrine monitoring of reproduction and stress. Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C, editors. *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management*. Chicago: The University of Chicago Press. p447-468.
- Hoffmann B, Bernhardt AW, Failing K, Schuler G. 2014. Profiles of estrone, estrone sulfate and progesterone in donkey (*Equus asinus*) mares during pregnancy. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 42: 32-39.
- Hofírek B, Němeček L. 2009. Onemocnění ledvin a vývodných cest močových. Hofírek B, Dvořák R, Němeček L, Doležel R, Pospíšil Z editors. Brno: Noviko, p457-467.
- Hoppen HO. 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin--an overview. *Experimental and Clinical Endocrinology* 102: 235-243.
- Hung NN, Prakash BS. 1990. Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in karan swiss cows and murrh buffaloes. *British Veterinary Journal* 146: 449-456.

- Hunnam JC, Parkinson TJ, McDougall S. 2009. Transcutaneous ultrasound over the right flank to diagnose mid- to late-pregnancy in the dairy cow. *Australian Veterinary Journal* 87: 313-317.
- Hussain Z, Sarzamin K, Yousaf A, Ahmad N, Rafiullah R, Sadia H, Munibullah M. 2016. Pregnancy diagnosis in dairy animals through inhibition of seed germination. *Journal of Applied Agriculture and Biotechnology* 1: 77-82.
- Hyniová L. 2015. Reproduction and pregnancy diagnosis in donkeys [MSc.]. Prague: Czech University of Life Sciences Prague, 51p.
- Islam MM, Sarker MB, Alam MH, Khan RI, Moniruzzaman M. 2014. Germination test of wheat for pregnancy diagnosis of goats and sheep. Subandriyo K, Krishna AS, Edi K, Agung P, Akhmad S, Komang GW, Siti D, Ismeth I, Darmono AP, Peter W, Jian LH, Jih TH, Zulkifiti I. 16th AAAP Animal Science Congress Vol. II. Sustainable Livestock Production in the Perspective of Food Security, Policy, Genetic Resources, and Climate Change. Yogyakarta: Gadjah Mada University. p947.
- Jaffe MB, Behrman HR. 1979. *Methods of hormone radioimmunoassay*. New York: Academic Press, Inc. 1070p.
- Juodžentytė R, Žilaitis V. 2016. Practical evaluation pregnancy of heifers by Punyakoti test. *Veterinarija ir Zootechnika* 74: 14-17.
- Kähn W. 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 28: 1-10.
- Kavani FS. 1976. Comparative study on the efficiency of different tests for early pregnancy diagnosis in cattle [MVSc.]. Udaipur: University of Udaipur.
- Khamasi K, Harbaoui K, Teixeira da Silva JA, Jeddi FB. 2013. Optimal germination temperature assessed by indices and models in field bean (*Vicia faba* L. var. *Minor*). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78: 131-136.
- Kim NH, Jeong JS, Kwon HJ, Lee YM, Yoon HR, Lee KR, Hong SP. 2010. Simultaneous diagnostic method for phenylketonuria and galactosemia from dried blood spots using high-performance liquid chromatography-pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography B* 878: 1860-1864.
- Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. 1982. Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* 32:353-359.

- Kirkpatrick JF, Bancroft K, Kincy V. 1992. Pregnancy and ovulation detection in bison (*Bison bison*) assessed by means of urinary and fecal steroids. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 590-597.
- Kirkpatrick JF, Kincy V, Bancroft K, Shideler SE, Lasley BL. 1991. Oestrus cycle of the North American bison (*Bison bison*) characterized by urinary pregnanediol-3-glucuronide. *Journal of Reproduction and Fertility* 93: 541-547.
- Kirkpatrick JF, Shideler SE, Turner W Jr. 1990. Pregnancy determination in uncaptured feral horses based on steroid metabolites in urine-soaked snow and free steroids in feces. *Canadian Journal of Zoology* 68: 2576-2579.
- Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C. (eds). 2010. *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management*. Chicago: The University of Chicago Press. 569p.
- Knox RV, Althouse GC. 1999. Visualizing the reproductive tract of the female pig using real-time ultrasonography. *Swine Health Production* 7: 207-215.
- Kober S. 1938. The colorimetric estimation of the oestrogenic hormones: Oestrone. *Biochemical Journal* 32: 357-365.
- Krishna Rao SV, Veena T. 2009. Comparison of seed germination test with urine barium chloride test and milk copper sulphate test for efficacy to detect pregnancy in cows. *Indian Journal of Animal Research* 43: 124-126.
- Kubátová A, Fedorova T, Skálová I, Hyniiová L. 2016. Non-invasive pregnancy diagnosis from urine by the Cuboni reaction and the barium chloride test in donkeys (*Equus asinus*) and Alpacas (*Vicugna pacos*). *Polish Journal of Veterinary Science* 19: 477-484.
- Kubátová A, Fedorova T. 2016. Saliva Crystallization Occurs in Female Bornean Orangutans (*Pongo pygmaeus*): Could It Be a New Option for Monitoring of Menstrual Cycle in Captive Great Apes? *PLoS ONE* 11(7): e0159960. doi:10.1371/journal.pone.0159960
- Kubátová A. 2014. *Pregnancy diagnosis from urine in even-toed ungulates [MSc.]*. Prague: Czech University of Life Sciences Prague, 85p.
- Kubátová A. 2015. *Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců [DP]*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 66p.
- Kudweis M. 2000. *Morfologie hospodářských zvířat pro posluchače zemědělských fakult: učebnice veterinární anatomie, histologie a embryologie*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Agronomická fakulta. 28p.
- Kullander S, Sonesson B. 1965. Studies on saliva in menstruating, pregnant and postmenopausal women. *Acta Endocrinologica* 48: 329–336.

- Kumar A, Mehrotra S, Dangi SS, Singh G, Chand S, Singh L, Mahla AS, Kumar S, Nehra K. 2013. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Veterinary World* 6: 59-63.
- Kume S, Sato T, Murai I, Kitagawa M, Nonaka K, Oshita T. 2011. Relationships between urine pH and electrolyte status in cows fed forages. *Animal Science Journal* 82: 456-460.
- Lalrintluanga K, Dutta M. 2009. Pregnancy Diagnosis in Swine from urine using Barium Chloride Test. *Indian Journal of Animal Research* 43: 114-116.
- Lee C, Herbek J. 2009. Growth and development. Lee C, Herbek J editors. *A comprehensive guide to wheat management in Kentucky*. Lexington: University of Kentucky College of Agriculture, p6-12.
- Leon JB, Smith BB, Timm KI, LeCren G. 1990. Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). *Journal of Reproduction and Fertility* 88: 503-511.
- Linford E. 1974. Cervical mucus: an agent or a barrier to conception? *Journal of Reproduction and Fertility* 37: 239-250.
- Llama-con.blogspot.cz. (2012). Female Reproductive Anatomy. Part 2. Available at <http://llama-con.blogspot.cz/2012/10/female-reproductive-anatomy-part-2.html>: Accessed 2017-05-28.
- Locvančić von H. 1969. Vergleichende Oestrogenbestimmungen im Harn hochträchtiger Kühe mit der Cuboni- und Lunaas-Reaktion sowie durch ein quantitativ-chemisches Verfahren. *Reproduction in Domestic Animals* 4: 77–83.
- Löfstedt R. 2004. Reproduction in South American Camelids. Amented from the original by Richardson GF. Available at <http://people.upei.ca/lofstedt/public/chromosome.puzzle/images%20for%20chromosomes/private/vhm321/vhm321.Books/new.world.camelids.pdf>: Accessed 2017-04-26.
- Loskutoff NM, Ott JE, Lasley BL. 1983. Strategies for assessing ovarian function in exotic species. *Journal of Zoo Animal Medicine* 14: 3-12.
- Loy RG. 1980. Characteristics of post partum reproduction in the mare. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice* 2: 345-359.
- Lunaas T. 1961. A new method for the detection and estimation of urinary oestrogens in the sow and its application for the early pregnancy diagnosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2: 301-310.

- Maatje K, Loeffler SH, Engel B. 1996. Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *Journal of Dairy Science* 80:1098-1105.
- Madamba R, Grubben GJH, Asante IK, Akromah R. 2006. Vigna. Brink M, Belay G editors. *Plant resources of tropical Africa. 1. Cereals and Pulses*. Wageningen: Prota Foundation/ Backhuys Publishers/ CTA, p208-229.
- Maslov N, Smirnov A. 1965. The simplest method for the early diagnosis of pregnancy. *Molochn Miasn Skotovod* 10:24-25.
- MaybeBaby: Available at <http://www.maybebaby.com>: Accessed 2017-03-26.
- Mayer DT. 1944. Comparative study of two biologic and two chemical techniques for pregnancy diagnosis in the mare. *American Journal of Veterinary Research* 5: 209.
- McDonnell SM. 1998. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). *Applied Animal Behaviour Science* 69: 277-282.
- Medan M, Watanabe G, Absy G, Sasaki K, Sharawy S, Taya K. 2004. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. *Journal of Reproduction and Development* 50: 391-397.
- Meira C, Ferreira JCP, Papa FO, Henry M. 1998. Ovarian activity and plasma concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies. *Theriogenology* 49: 1465-1473.
- Mottershead J. 2001. The Mare's Estrous Cycle. *Equine Reproduction*. Available at <http://www.equine-reproduction.com/articles/estrous.htm>: Accessed 2017-04-26.
- Murphy BD, Martinuk SD. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews* 12:27-44.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2000. *Harper's Biochemistry*. Michigan: Appleton & Lange, 927p.
- Musa B, Merkt H. 1990. Anatomy and physiology of reproduction: Female organs. Merkt H., Rath D., Musa B, El-Naggar MA. eds. *Reproduction in camels: A review*. FAO Animal Reproduction and Health Paper. 82. p10-14.
- Narayana Swamy M, Ravikumar C, Kalmath GP. 2010. Seed germination inhibition test for pregnancy detection in Malnad Gidda cows. *Veterinary World* 3: 107-108.
- Ndu A, Bratte L, Eyoufe S. 2000b. A preliminary trial on the use of barium chloride for pregnancy diagnosis in sows. *Tropicultura* 18: 161-163.
- Ndu A, Bratte L, Chiboka O. 2000a. A preliminary trial on the use of barium chloride for pregnancy diagnosis in pigs. *Nigerian Journal of Animal Production* 27: 9-11.

- Nirmala G, Veena T, Jyothi M, Suchitra B. 2008. Effect of estrogen and progesterone on seed germination. *Veterinary World* 1: 241-242.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, Arthur GH. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. London: Saunders. 868p.
- Noonan JJ, Schultze AB, Ellington EF. 1975. Changes in bovine cervical and vaginal mucus during the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Animal Science* 41: 1084-1089.
- Norn M. 1988. Quantitative tear ferning. Methodologic and experimental investigations. *Acta Ophthalmologica* 66: 201-205.
- O'Moore LB. 1947. Sex hormones in the urine of pregnant cattle. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 57: 36-46.
- Ohazurike EE. 1990. Pregnancy diagnosis in ewes and goat does using urine and 2% barium chloride solution [BSc.]. Ile-Ife: Obafemi Awolowo University, 24p.
- Osborn L. 2016. Weather averages, Current Results Publishing Ltd. Available at <http://www.currentresults.com/Weather/>: Accessed 2016-12-08.
- Othaki T, Moriyoshi M, Nakada K, Nakao T, Kawata K. 1997. Radioimmunoassay of saliva estrone sulfate in pregnant sows. *Journal of Veterinary Medical Science* 59: 759-763.
- Papanicolaou GN. 1946. A general survey of the vaginal smear and its use in research and diagnosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 51: 316-328.
- Pardo-Carmona B, Moyano MR, Fernández-Palacios R, Pérez-Marín CC. 2010. Saliva crystallisation as a means of determining optimal mating time in bitches *Journal of Small Animal Practice* 51: 437-442.
- Patel OV, Takenouchi N, Takahashi T, Mirako M, Sasaki N, Domeki I. 1999. Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number. *Research in Veterinary Science* 66: 129-133.
- Pattansattinont S, Sereepapong W, Suwajanakorn S. 2007. The salivary ferning test and ovulation in comiohene citrate-stimulated cycles. *Journal of the Medical Association of Thailand* 90: 876-883.
- Pearson LK, Rodriguez JS, Tibary A. 2014. Postpartum Disorders. Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW editors. *Llama and Alpaca Care – E-Book: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health*. St. Louis, USA: Elsevier Health Sciences, p308
- PennState Extension. 2017. Estrous Detection Aids. Available at <http://extension.psu.edu/animals/dairy/health/reproduction/insemination/ec402/estrous-detection-aids>: Accessed 05-29-2017.

- Pensyl CD, Dillehay SM. 1998. The repeatability of tear mucus ferning grading. *Optometry and Vision Science* 75: 600-604.
- Perumal P. 2014. Pregnancy diagnosis by seed germination inhibition test in mithun (*Bos frontalis*) cows. *Indian Journal of Applied Research* 4: 531-532.
- Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ. 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 71: 1333-1342.
- Peterson DL. 1984. Nasal mucus ferning patterns [MSc.]. Salt Lake City: University of Utah, 51p.
- Phillips CJC. 2010. Principles of cattle production. Cambridge: Cambridge University Press. 233p.
- Porstmann T, Kiessig ST. 1992. Enzyme immunoassay techniques: an overview. *Journal of Immunological Methods* 150: 5-21.
- Purohit G. 2010. Methods of Pregnancy Diagnosis in Domestic Animals. The Current Status – WebMedCentral REPRODUCTION. 1:WMC001305.
- Raggi LA, Ferrando G, Parraguez VH, MacNiven V, Urquieta B. 1999. Plasma progesterone in alpaca (*Lama pacos*) during pregnancy, parturition and early postpartum. *Animal Reproduction Science* 54: 245-249.
- Rao Krishna SV, Veena T. 2009. Evaluation of seed germination test for early detection of pregnancy in cows. *Indian Journal of Animal Research* 43: 37-40.
- Reece WO. 2013. Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals. John Wiley & Sons, Inc. 592p.
- Renner-Martin TFP, Forstenpointner G, Weissengruber GE, Eberhardt L. 2009. Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38: 133-138.
- Riad MT. 1993. Urinary estrogens and progestins in pregnant pony mares. [MSc.]. Corvallis: Oregon State University, 104p.
- Rine M, Hossain M, Akter S, Tarif A, Bari F, Alam M. 2014. Evaluation of seed germination inhibition test for early detection of pregnancy in cross breed dairy cattle in Bangladesh. *Journal of Veterinary Advances* 4: 343-349.
- Riveros JL, Schuler G, Urquieta B, Hoffmann B, Bonacic C. 2015. Ovarian follicular activity during late gestation and postpartum in guanaco (*Lama guanicoe*). *Reproduction in Domestic Animals* 50: 129-134.

- Riveros JL, Urquieta B, Bonacic C, Hoffmann B, Bas F, Schuler G. 2009. Endocrine changes during pregnancy, parturition and post-partum in guanacos (*Lama guanicoe*). *Animal Reproduction Science* 116: 318-325.
- Rob O, Stehlík I. 1983. Cvičení z reprodukce hospodářských zvířat II. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 122p.
- Robertson HA, King GJ. 1979. Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 55: 463-470.
- Rodriguez JS, Pearson LK, Tibary A. 2014. Parturition and Obstetrics. Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW editors. *Llama and Alpaca Care – E-Book: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health*. St. Louis, USA: Elsevier Health Sciences, p278.
- Rolando M, Baldi F, Calabria G. 1988. Tear mucus crystallization in children with cystic fibrosis. *Ophtalmologica* 197: 202-206.
- Rorie RW, Bilby TR, Lester TD. 2002. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology* 57: 137-148.
- Sartori R, Barros CM. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 124: 244-250.
- Sathe SR. 2012. Evaluation of Salivary Progesterone Profiles as an Indicator of Reproductive Status in Equines [MSc.]. Urbana-Champaign: University of Illinois, 67p.
- Savio JD, Boland MP, Roche JF. 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 88:581-591.
- Shah KD, Nakao T, Kubota H. 2006. Plasma estrone sulphate (E1S) and estradiol-17 β (E2 β) profiles during pregnancy and their relationship with the relaxation of sacrosciatic ligament, and prediction of calving time in Holstein-Friesian cattle. *Animal Reproduction Science* 95: 38-53.
- Schwarzenberger F, Tomášová K, Holečková D, Matern B, Möstl. 1996. Measurement of fecal steroids in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-Oxo-Pregnanes. *Zoo Biology* 15: 159-171.
- Sink CA, Weinstein NM. 2012. *Practical veterinary urinalysis*. Chichester: John Wiley & Sons. 169p.
- Sist MD, Youngblood MA, Williams JF, Glade MJ. 1988. Salivary and serum estrone sulfate levels in pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 8: 164-167.

- Skalova I, Fedorova T, Brandlova K. 2013. Saliva crystallization in cattle: New possibility for early pregnancy diagnosis? *Agricultura Tropica et Subtropica* 46: 102-104.
- Skálová I. 2012. Saliva crystallization in cattle. [MSc.]. Prague: Czech University of Life Sciences Prague, 66p.
- Skidmore JA, Billah M, Allen WR. 1996. The ovarian follicular wave pattern and induction of ovulation in the mated and non-mated one-humped camel (*Camelus dromedarius*), *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 185-192.
- Skidmore JA. 2000. Pregnancy Diagnosis in Camels. Skidmore JA, Adams GP editors. *Recent Advances in Camelid Reproduction: International Veterinary Information Service*. Available at www.ivis.org: Accessed 2017-04-20.
- Smith JW, Spahr SL, Puckett HB. 1989. Electrical conductivity of reproductive tissue for detection of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 693-701.
- Sundra TM, Accioly JM, Costa ND, Pethick DW, Tudor GD, Taylor EG, Pluske JR. 2004. Dietary control of urinary pH in sheep during live export. *Animal Production in Australia* 25: 323.
- Temblador ASR, Acosta BH. 1971. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by means of coagulating milk in a 3 percent copper sulfate solution. VII. Informe Anual de Investigación. Escuela de Agricultura y Ganadería. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores 70: 144.
- Tosi U, Bernabó N, Verni F, Valnonetti L, Muttini A, Mattioli M, Barboni B. 2013. Postpartum reproductive activities and gestation length in Martina Franca jennies, an endangered Italian donkey breed. *Theriogenology* 80: 120-124.
- Tsuimira L, Sasaki H, Maeta T. 1960. Studies on sterility of cows. IV. Crystallization pattern and cellular changes of nasal mucus during the sexual cycle. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 13: 306-309.
- Vandeplassche GM, Wesson JA, Ginther OJ. 1981. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. *Theriogenology* 16.
- Veena Ganesaiah T. 2006. Punyakoti Test – An Ancient Egyptian Test (2200 BC) Extended to Diagnose Pregnancy in Cattle. Balasubramanian A, Nirmala Devi T editors. *Traditional Knowledge Systems of India and Sri Lanka*. Bangalore: Centre for Indian Knowledge Systems. pp91-93.
- Veena T, Narendranath R. 1993. An ancient Egyptian pregnancy test extended to cattle. *Current Science* 65: 989-990.

- Vlček Z. 1982. Late puerperium and the new reproductive cycle in cows with regard to restoration of their ovarian activity, estrus and the first postpartal ovulation. *Acta Veterinaria Brno* 51: 75-80.
- Volkery J, Gottschalk J, Sobiraj A, Wittek T, Einspanier A. 2012. Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis *Veterinary Record* 171: 195.
- Volkery J, Wittek T, Sobiraj A, Gottschalk J, Einspanier A. 2010. Progesterone and pregnanediol-glucuronid concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas and their application in pregnancy diagnosis. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal* 123: 500-505.
- Von Locvančić H. 1969. Vergleichende Oestrogenbestimmungen im Harn hochträchtiger Kühe mit der Cuboni- und Lunaas- Reaktion sowie durch ein quantitativ-chemisches Verfahren. *Reproduction in Domestic Animals* 4: 77-83.
- Vyas S, Purohit GN, Pareek PK, Sahani MS. 2002. Ultrasonographic Imaging to monitor Early Pregnancy in the Camel (*Camelus dromedarius*). *Revue D'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux* 55: 241-245.
- Wani NA, Shabeena M, Misra AK, Maurya SN. 2003. Pregnancy diagnosis in farm animals – a review. *Indian Journal of Dairy Science* 56: 1-8.
- Wendorf GL, Lawyer MS, First NL. 1983. Role of the adrenals in maintenance of pregnancy in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 68: 281-287.
- White J, Edwards J. 2008. Wheat growth and development. South Wales: PROCROP, Department of Primary Industries. 104p.
- Whittier JC, Thorne JG. 2015. Assisting the beef cow at calving time. Available at <http://www.cattlenetwork.com/advice-and-tips/cowcalf-producer/assisting-beef-cow-calving-time>: Accessed 06-01-2017.
- Williams DJ. 1964. Cervical mucus test yields fast, accurate diagnosis. *Modern Veterinary Practice* 45: 45-51.
- Xue Y, Jiang X, Liu S, Lei H, Lu Y, Lu N, Yao W, Xia D. 2017. The changes of fecal steroid hormones and bacterial composition in different gestation stages of Meishan Sows. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 7: 589.
- Yang CJ, Wu LS, Liu SH, Lin JH. 2004. Monitoring the reproductive status of dairy cows by urinary pregnanediol glucuronide. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 17: 460-466.

- Yang CJ, Wu LS, Tseng CM, Chao MJ, Chen PC, Lin JH. 2003. Urinary estrone sulfate for monitoring pregnancy of dairy cows. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 16: 1254-1260.
- Zondek B, Cooper K. 1954. Cervical mucus in pregnancy: Inability of estrogen to produce arborization in pregnancy and its clinical significance. *Obstetrics and Gynecology* 4: 484-491.
- Zondek B, Rozin S. 1954. Cervical mucus arborization. Its use in the determination of corpus luteum function. *Obstetrics and Gynecology* 3: 463-470.
- Zondek B. 1959. Arborization of Cervical and Nasal Mucus and Saliva. *Obstetrics & Gynecology* 13: 477-481.

10 Přílohy

Příloha 1:

Některé z výsledků byly součástí tří diplomových prací souvisejících s tématem této disertační práce a grantem CIGA ČZU v Praze (číslo projektu: 51120/1312/3110).

Téma 1: Diagnostika březosti z moči u sudokopytníků.

autor: Ing. Anna Kubátová

školitel: Ing. Tamara Fedorova, Ph.D.

konzultant: Ing. Iva Skálová

Citace: Kubátová A. 2014. Pregnancy diagnosis from urine in even-toed ungulates [MSc.]. Prague: Czech University of Life Sciences Prague, 85p.

Téma 2: Reprodukce a diagnostika březosti u oslů.

autor: Ing. Lucie Hyniová

školitel: Ing. Tamara Fedorova, Ph.D.

konzultant: Ing. Iva Skálová

Citace: Hyniová L. 2015. Reproduction and pregnancy diagnosis in donkeys [MSc.]. Prague: Czech University of Life Sciences Prague, 51p.

Téma 3: Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců.

autor: Ing. Anna Kubátová

školitel: Mgr. Vladimír Vrabec, Ph.D.

konzultanti: Ing. Tamara Fedorova, Ph.D., Ing. Iva Skálová

Citace: Kubátová A. 2015. Monitoring cyklu a březosti pomocí krystalizace slin a faktory, které ji ovlivňují u exotických savců [DP]. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 66p.

