

ZYGMUNT PEJSAK, WILLIAM L. MENGELING *

Doświadczalne zakażenie płodów świni różnymi dawkami parwowirusa świń

Zakład Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
* National Animal Disease Center, Ames 50010 Ia, USA

Cartwright i Huck (3) jako pierwsi w świecie, na podstawie badań własnych, wyrazili w 1967 r. opinię, że parwowirus świń (PPV) odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie zaburzeń rozrodu. Opinia ta została następnie poparta wynikami prac wielu innych autorów (2, 6, 8, 9, 12, 13, 17, 20, 23).

W Polsce Larski (10) pierwszy zwrócił uwagę na znaczenie PPV wśród przyczyn zmniejszonej płodności świń, a Pejsak i wsp. (19) opracowali monograficzny przegląd piśmiennictwa na ten temat. Pierwszej izolacji PPV dokonano w kraju w 1983 r. w Zakładzie Badania Chorób Świń Instytutu Weterynarii w Puławach (24).

W patogenezie parwowirusowego zakażenia świń w warunkach naturalnych ustalono, że zjadliwe szczepy tego zarazka przechodząc przez barierę łożyskową powodują obumieranie płodów w pierwszej połowie ciąży (1, 6, 18). Podobne efekty uzyskiwano też w warunkach doświadczalnych, zakażając zjadliwym szczepem PPV doomocznio i dozarodkowo płody łoż, u których zaawansowanie ciąży nie przekraczało 10 tygodni (4, 11, 14, 21, 22). Należy jednak zaznaczyć, że na każdy płód przeznaczono w tych doświadczeniach dość znaczną dawkę wirusa.

Ponieważ uzyskane w wymienionych badaniach wyniki mają wyłącznie jakościowy charakter, uznano za celowe podjęcie prezentowanej pracy własnej. Jej celem jest próba zdobycia istotnych z patogenetycznego punktu widzenia danych na temat związku między dawką PPV, a zamieralnością płodów zakażonych wymienionym wirusem *in utero*.

Materiał i metody

Do badań użyto:

- terenowy szczep parwowirusa świńskiego NADL-8, wyosobniony ze zmumifikowanych płodów, a następnie poddany trzykrotnemu pasażowaniu przez płody świń (18);
- pierwotną hodowlę nerki płodu świni (fetal porcine kidney — FPK); używany przy jej uzyskiwaniu płyn wzrostowy posiadał skład zaproponowany przez Mengelinga (15);
- cztery loszki (nr 346, 611, 199, 176) będące w 42—46 dniu ciąży.

Postępowanie. U wymienionych loszek, po poddaniu ich narkozie halotanowej, wykonywano laparotomię. Następnie z otwartej jamy brzusznej wyjmowano macicę i w jej rogach oznaczano położenie poszczególnych płodów, zakładając w odpowiednich miejscach zewnętrznej ściany rogów macicy pojedyncze szwy chirurgiczne z różnokolorowego jedwabiu. Dalszy tok postępowania obejmował: doowodniowe

zakażenie płodów, wprowadzenie macicy z powrotem do jamy brzusznej, zszycie otrzewnej, mięśni i tkanki podskórnej katgutem oraz skóry jedwabiem. Do zakażenia doowodniowego płodów używano płynu wirusowego (zawiesina hodowli komórek FPK, w której namnożono PPV, szczep NADL-8, uzyskując miano wirusa $CCID_{50}=10^{-7.66}$ (0,2 ml), poddanego kolejnym rozcieńczeniom od 10^{-1} do 10^{-9} . Jednym z tych rozcieńczeń zakażono doowodniowo, po 0,2 ml, poszczególne płody trzech pierwszych loszek (346, 611, 199). U czwartej samicy (176) zakażono w podobny sposób tylko 5 płodów, stosując rozcieńczenia 10^{-5} do 10^{-9} . W celu wykluczenia możliwości śródmacicznego zakażenia się płodów między sobą, wirus podawano tylko co drugiemu z nich. W tym układzie płody doświadczalne — zakażone, były poprzedzielane nie zakażonymi — kontrolnymi. W dwa tygodnie później, po eutanazji loszek przy użyciu sukcyntylcholiny, dokonywano histerektomii, wyjmowano płody z macicy, oznaczano je, a następnie pobierano od każdego z nich wycinki płuc — w kierunku ewentualnego wykrycia obecności antygeny wirusowego oraz wycinki płuc, nerek i śledziony z myślą o wyizolowaniu z tych narządów PPV.

Od loszek pobierano trzykrotnie krew — na dwa tygodnie przed zakażeniem płodów, w dniu ich zakażenia, oraz w dniu eutanazji — w celu wykonania badań diagnostycznych na obecność swoistych przeciwciał anti-PPV. Identycznym badaniom poddawano surowicę krwi pobranej od płodów, które pozostały przy życiu.

Wykrywanie obecności PPV. Zawiesinę (10%) tkanki płucnej uzyskiwano przez roztrarcie 0,5 g wycinka tego narządu w 4,5 ml płynu Eagle'a z dodatkiem gentamycyny (200 µg/1 ml). Uzyskaną zawiesinę wiorowano. Supernatantem zakażano 72-godzinna hodowlę pierwotną FPK w próbkach Leightona ze szkiełkami podstawowymi. Materiałem pochodzącym z jednego płodu zakażono dwie próbki. Po 48 godzinach zmieniano płyn utrzymujący, a po kolejnych 24 godzinach sprawdzano preparaty metodą IF (15).

Wykrywanie obecności antygeny. Uzyskane przy pomocy mikrotomu mrożeniowego 0,2 µ grubości skrawki płuc płodów badano metodą IF.

Wykrywanie obecności przeciwciał. Poziom przeciwciał w surowicy krwi loszek i żywych płodów określano metodą hamowania hemaglutynacji (HI).

Wyniki i omówienie

Wszystkie zarodki zakażone zjadliwym szczepem PPV w rozcieńczeniach 10^0 — 10^{-6} obumarły lub były bliskie śmierci, w okresie 14 dni po infekcji (tab. 2, ryc. 1, 2). Należy przy tym zaznaczyć, że stopień rozwoju obumarłych płodów pozwolił na stwierdzenie prostej zależności między wielkością wprowadzonej dawki zarazka a szybkością ich zamierania. Zarodki zakażone niskimi rozcieńczeniami, czyli większą dawką wirusa (10^0 — 10^{-2}) obumarły wcześniej niż te, którym podano rozcieńczeniem wyższe.

Wirus izolowano (tab. 3, ryc. 3) ze wszystkich zakażonych płodów należących do loszki nr 611 oraz od płodów zakażonych rozcieńczeniami od 10^{-6} PPV, pochodzącymi od loszek nr

199 i 176. W czwartym miocie (loszka nr 346) wirus wycoznaczono jedynie z płodów zakażonych rozcieńczeniami 10^0 — 10^{-5} PPV. Nie wykryto natomiast wirusa u żadnego z płodów kontrolnych.

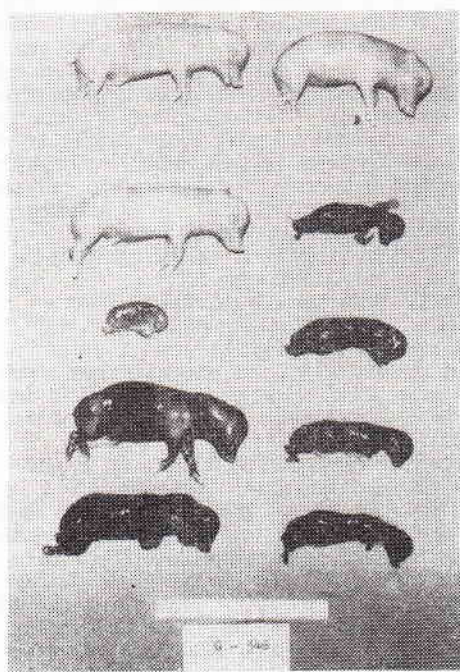
Tab. 1. Poziom przeciwciał HI anty — PPV w surowicach badanych loszek

Nr loszki	Termin badania		
	2 tygodnie przed zakażeniem płodów	w dniu zakażenia płodów	2 tygodnie po zakażeniu płodów
G — 346	1280	2560	1280
G — 611	169	320	1280
G — 199	nie badano	1280	2560
G — 176	nie badano	1280	2560

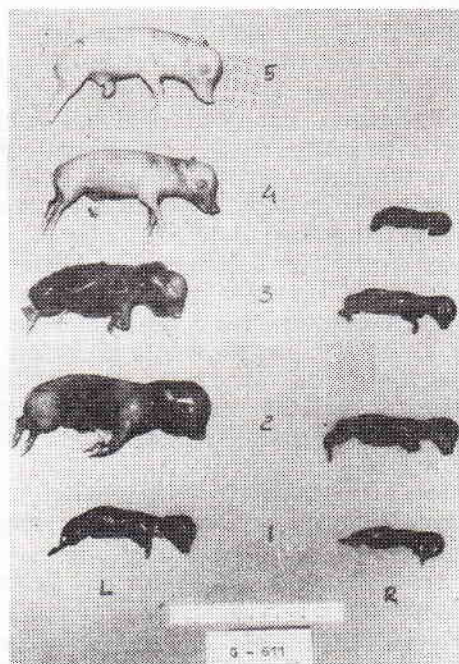
Antygen wirusowy (tab. 4, ryc. 4) stwierdzono we wszystkich badanych tkankach (nerka, śledziona, płuca) płodów martwych i żywych, zakażonych rozcieńczeniami: 10^0 — 10^{-8} (loszka nr 611), 10^0 — 10^{-7} (loszka nr 199), 10^0 — 10^{-6} (loszka nr 176) i 10^0 — 10^{-5} (loszka nr 346).

U żadnego z płodów, zarówno doświadczalnych, jak i kontrolnych, nie wykazano w surowicy krwi obecności przeciwciał HI anty-PPV (tab. 3). Natomiast przeciwciała takie stwierdzano przez cały okres doświadczenia w surowicach użytych do badań loszek (tab. 1).

Dotychczas opublikowano zaledwie kilka prac doświadczalnych, których przedmiot sta-



Ryc. 1. Miot loszki nr 346. Płody ułożone wg ich pozycji w rogach macicy. Płód w górnym prawym rogu nie zakażony. Pozostałe płody ułożone kolejno od górnego prawego rogu macicy do górnego lewego rogu zakażone wzrastającymi rozcieńczeniami (od 10^0 — 10^{-8}) PPV



Ryc. 2. Miot loszki nr 611. Płody ułożone wg ich pozycji w rogach macicy. Płody kolejno od górnego prawego rogu macicy do górnego lewego rogu zakażone wzrastającymi rozcieńczeniami (od 10^0 — 10^{-8}) PPV

Tab. 2. Stan płodów w 14 dniu po doowodniowym zakażeniu różnymi rozcieńczeniami PPV

Nr loszki	Rozcieńczenia wirusa użytego do zakażenia płodów										nie zakażone
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
G-346	martwy	martwy	martwy	martwy	martwy	martwy	x	żywy	żywy		żywy
G-611	martwy	martwy	martwy	martwy	martwy	martwy	martwy	żywy	żywy		
G-199						martwy	martwy	słabo żywotny	żywy		
G-176						x	stan agonalny	słabo żywotny	żywy	x	żywy

Objaśnienie: x — płód uśmiercony w trakcie zakażenia.

Tab. 3. Występowanie parwowirusa świń i przeciwciał HI anty-PPV u płodów zakażonych doświadczalnie

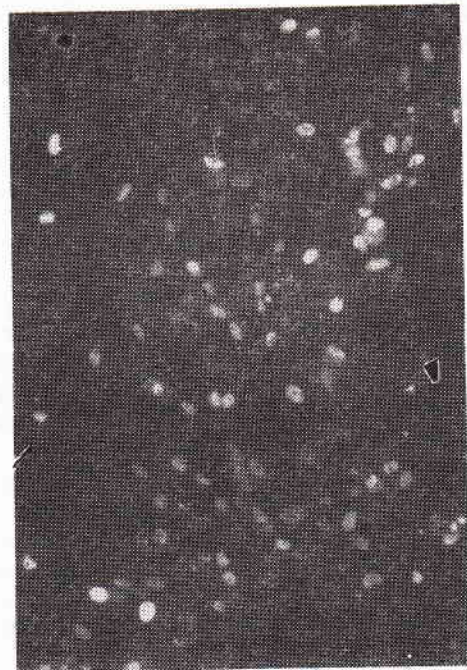
Nr loszki	Test w kierunku	Rozcieńczenia wirusa użytego do zakażenia podów										Nie zakażone
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
G - 346	Wirus Przeciwciała	+	+	+	+	+	+	×	<5	<5		<5
		××	××	××	××	××	××	××				
G - 611	Wirus Przeciwciała	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		××	××	××	××	××	××	××	<5	<5		
G - 199	Wirus Przeciwciała						+	+	V			
							××	××	<5	<5		
G - 176	Wirus Przeciwciała						+	+	<5	<5	<5	<5
									<5	<5	<5	<5

Objaśnienia: × — płód uśmiercony w trakcie zakażenia, ×× — płód martwy, nie wykonano testu HI, V — brak możliwości uzyskania tkanki ze względu na wczesną mumifikację zarodka.

nowiło doomoczniove (4, 14) i dozarodkowe (1, 11, 21, 22) zakażenie płodów świń zjadliwym szczepem PPV. Uzyskane wyniki były uzależnione od okresu ciąży, w którym dokonywano wymienionego zabiegu (4, 14), od patogenności użytego szczepu wirusa (16), a zdaniem niektórych autorów — także od stanu immunologicznego samicy (22).

Omawiane badania własne dostarczają danych, które w pewnej mierze uzupełniają wyniki powyższych prac, wskazując na to, że u ciężarnych loch istnieje prosty związek między wielkością wprowadzonej doowodniowo dawki zjadliwego wirusa a zamieralnością zakażonych 7—8 tygodniowych płodów oraz szybkością jej następowania. Szczep parwowirusa NADL-8, zastosowany w pracy własnej okazał się wysoce patogenny. Powodował bowiem śmierć płodów w ciągu 14 dni i to nawet wówczas, kiedy podano go w dawce około milion razy mniejszej od używanej do powyższego celu przez Mengelinga i Cutlipa (14). Należy przy tym zaznaczyć, że miały miejsce indywidualne różnice w stanie klinicznym płodów zakażonych tymi samymi dawkami NADL-8. Na przykład zarodek loszki nr 346, który otrzymał doowodniowo 0,2 ml rozcieńczenia 10⁻⁷ PPV pozostał żywy, a z jego tkanek nie wyizolowano parwowirusa świń, podczas gdy stan kliniczny loszek nr 199 i 176, które zakażono identyczną dawką wirusa, wskazywał na znaczne zaawansowanie procesu chorobowego i bliską ich śmierć, a z tkanek tych płodów izolowano PPV. Zdaniem Mengelinga i Cutlipa (14) powyższe różnice w patogenności PPV mogą być spowodowane zaburzeniami w replikacji wirusa lub, co wydaje się bardziej prawdopodobne, niedokładnym podaniem zarazka.

Wyniki badań własnych przemawiają też za tym, że PPV namnaża się łatwo w tkankach płodów świni, a jego koncentracja w ich płucach wydaje się być ściśle związana z ilością antygeny użytego do zakażenia. Na uwagę zasługuje fakt, że izolacji wirusa dokonano także z płodów zakażonych rozcieńczeniami 10⁻⁷ i 10⁻⁸, a więc minimalną dawką NADL-8. God-



Ryc. 3. Pierwotna hodowla komórek nerki płodu świń w 72 godz. po zakażeniu PPV, barwiona swoistą koniugata

nym podkreślenia jest również to, że nie obserwowano zmian patologicznych u żadnego z płodów kontrolnych, a próby wyosobnienia wirusa też wypadły negatywnie. Może to przemawiać za brakiem wewnątrzmacicznego rozprzestrzeniania się PPV przy doowodniowym zakażeniu 42—45 dniowych płodów. Podobne wyniki, zakażając doomoczniovo 3—5 tygodniowe zarodki, uzyskali Mengeling i Cutlip (14). Natomiast Bachmann i wsp. (1), Redman i wsp. (22), Cutlip i Mengeling (4) oraz Prozesky i wsp. (21) wykazali istnienie ograniczonej wewnątrzmacicznej transmisji omawianego wirusa. Zagadnienie powyższe wymaga jeszcze dalszych, szczegółowych badań przy użyciu odpowiedniego materiału biologicznego.

Według teoretycznych rozważań Mengelinga i Cutlipa (14), w procesie śródmacicznego rozprzestrzeniania wirusa istotną rolę odgry-

Tab. 4. Wykrywanie antygeny w tkankach płodów w 14 dniu po zakażeniu różnymi rozcieńczeniami PPV

Nr loszki	Rozcieńczenia wirusa użytego do zakażenia płodów											Nie zakażone																					
	10 ⁰			10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			10 ⁻⁹					
	n	p	s	n	p	s	n	p	s	n	p		s	n	p	s	n	p	s	n	p	s	n	p	s	n	p	s	n	p	s	n	p
G-346	V+V			V+V			V+V			V+V			V++			++V			x														
G-611	++V			V+V			V+V			V+V			V++			++V			+++			+++			+++								
G-199				V+V			V+V			V+V			V++			++V			+++			+++			+++								
G-176																x			V+V			---			---								

Objaśnienia: n — nerka, s — śledziona, p — płuca, V — brak możliwości uzyskania tkanki ze względu na wczesną mumifikację zarodka, x — płód uśmiercony w trakcie zakażenia.

wa stan immunologiczny matki. Autorzy ci wysuwają hipotezę, że swoiste dla PPV przeciwciała samicy mogą przechodzić przez część maczyną łożyska i dostawać się na powierzchnię kosmówki. Utworzona w ten sposób bariera immunologiczna ma chronić, mniej lub bardziej, poszczególne płody przed zakażeniem. Cutlip i Mengeling (4) uważają poza tym, że martwe miejsca styku między poszczególnymi pęcherzami płodowymi zarodków (5) stanowią mogą barierę dla namnażania się wirusa i kontaktowego zakażenia zarodków, ponieważ replikacja wirusa uzależniona jest od aktywności enzymów, biorących udział w syntezie komórkowego DNA. W tym kontekście wymienieni autorzy wyrażają pogląd, że wewnątrzmaciczna transmisja wirusa odbywać się może najprawdopodobniej na drodze mechanicznego przenoszenia PPV przez fagocyty.

Brak przeciwciał HI anty-PPV u płodów zakażonych między 42—45 dniem życia przemawia za tym, że nie dysponują one jeszcze w tym okresie układem immunologicznym, zdolnym do reakcji na wprowadzony do organizmu wirus. Zdaniem większości autorów (1, 6, 17) immunokompetencja płodów świń pojawia się dopiero około 70 dnia ich życia, przy czym mogą tu występować znaczne różnice osobnicze. Podawany jest np. fakt stwierdzenia przeciwciał HI po zakażeniu 56-dniowego płodu (14). Obecność takich przeciwciał w surowicach loszek użytych w pracy własnej była niewątpliwie rezultatem wcześniejszego kontaktu samic z parwowirusem świń. Warto przy tym zwrócić uwagę, że fakt ten nie miał wpływu na wyniki pracy, ponieważ przeciwciała nie przechodzą przez barierę łożyskową świń do płodów.

Wyniki wykrywania antygeny wirusowego metodą IF nie pozostawiają wątpliwości, że był on obecny we wszystkich badanych tkankach płodów, z których izolowano wirus. Koncentracja antygeny w badanych tkankach okazała się skorelowana z ilością wirusa użytego do zakażenia zarodków. Kilham i Margolis (7) ustalili jednoznacznie, że parwowirusy znajdują najlepsze warunki do replikacji w tkankach zbudowanych z komórek charakteryzujących się nasiloną aktywnością mitotyczną.



Ryc. 4. Skrawek tkanki płucnej płodu zakażonego rozcieńczeniem 10⁻³ PPV. Specyficzna fluorescencja wydoczna w jądrach komórek

Przeto tkanki takie, a właściwie narządy z nich zbudowane (płuca, śledziona), wydają się być szczególnie przydatne m.in. w diagnostyce PPV.

Wnioski

1. Użyty do badań zjadliwy szczep parwowirusa świń posiada znaczne właściwości letalne, bowiem nawet w rozcieńczeniu 10⁻⁸ zawierającym 81 CCID₅₀ powoduje regularne obumieranie zakażonych nieimmunokompetentnych płodów.

2. Okres czasu między zakażeniem płodu a jego obumarciem jest dłuższy, im mniejsza jest dawka użytego do wymienionego celu wirusa.

Piśmiennictwo

1. Bachmann P. A.: Am. J. vet. Res. 37, 1393, 1976.
2. Bachmann P. A., Sheffy B. E., Vaughan J. T.: Immunity 12, 455, 1975.
3. Cartwright S. F., Huck R. A.: Vet. Rec. 81, 196, 1967.
4. Cutlip R. C., Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 36, 1751, 1975.

5. Flood P. T.: J. Reprod. Fert. 32, 539, 1973.
6. Joo H. S., Donaldson-Wood C. R., Johnson R. H.: Arch. Virol. 47, 337, 1976.
7. Kilham L., Margolis G.: Am. J. Path. 49, 457, 1966.
8. Kudroň E., Mocsari G.: Magy. Allatorv. Lap. 34, 404, 1979.
9. Krogsrud J., Ødegaard Ø., Frøyedal K., Kariberg K., Benjaminsen E.: Norsk Veterinærtidsskrift 91, 309, 1979.
10. Larski Z.: Medycyna Wet. 34, 641, 1978.
11. Lenghaus C., Forman A. J., Hale C. J.: Aust. vet. J. 54, 418, 1978.
12. Mayr A., Bachmann P. A., Siegel G., Mahnel H., Sheffy B. E.: Arch. ges. Virusforsch 25, 38, 1968.
13. Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 33, 2239, 1972.
14. Mengeling W. L., Cutlip R. C.: Am. J. vet. Res. 36, 1173, 1975.
15. Mengeling W. L.: Ann. Proc. Am. Ass. Vet. Lab. Diag. 1977, Ames.
16. Mengeling W. L., Pejsak Z.: Am. J. vet. Res. (w druku).
17. Morimoto T., Fujisaki Y., Ito Y., Tanaka Y.: Natl. Inst. Anim. Health 12, 137, 1972. Tokyo.
18. Paul P. S., Mengeling W. L.: Am. J. vet. Res. 41, 2007, 1980.
19. Pejsak Z., Wójcik J., Karpinski S.: Medycyna Wet. 39, 451, 1983.
20. Pini A.: J. S. Afr. vet. med. Ass. 46, 241, 1975.
21. Prozesky L., Thompson G. R., Gainaru M. D., Herr S., Kritzing L. J.: Onderstepoort J. vet. Res. 47, 269, 1980.
22. Redman D. R., Bohl E. H., Ferguson L. C.: Infect. Immun. 10, 718, 1975.
23. Stepanek K.: Vet. Med. Praga 24, 149, 1979.
24. Wójcik J., Pejsak Z.: Medycyna Wet. (w druku).

Adres autora: dr Zygmunt Pejsak, ul. XX-Lecia PRL 6/15, 24-100 Puławy

Пейсак З., Менгелинг В. Л. — Экспериментальная инфекция плодов свиней различными дозами парвовируса свиней

Цель работы состояла в установлении влияния величины дозы парвовируса на замирание плодов, инфицированных экспериментально in utero в первой половине беременности.

Установлено, что все зародыши, индифицированные вирулентным штаммом парвовируса в разбавлениях 10^0 – 10^{-6} , умерли или были близки смерти в период 14 дней после инфекции. Вирус был изолирован в крайнем случае даже из плода, индифицированного разбавлением 10^{-6} . Вирусный антиген отмечился в I случае у плода, индифицированного разбавлением 10^{-8} , а регулярно — у плодов, индифицированных разбавлением 10^{-5} парвовируса. В крови всех индифицированных плодов не обнаружено противотел HI антипарвовирусу.

Pejsak Z., Mengeling W. L. — Experimental infection of swine fetuses with different doses of pig parvovirus (PPV)

The purpose of the work was to establish the size of PPV causing the death of fetuses experimentally infected in utero in the first half of pregnancy. It was found that all fetuses infected with a virulent strain of PPV in a dilution from 10^{-4} to 10^{-6} died or were near death within 14 days since infection. The virus was isolated regularly from the fetuses infected with dilutions of 10^{-5} and in one case even with a dose of virus diluted 10^{-8} . HI antibodies were not found in sera of fetuses infected with PPV.

KRYSTYNA JAKUBÓW, JOANNA GROMADZKA-OSTROWSKA,
BARBARA ZALEWSKA, ELŻBIETA SZYLARSKA-GÓŹDŹ

Zmiany w morfologicznym obrazie krwi podczas cyklu estralnego prymitywnych przedstawicieli rodzaju *Sus*

Laboratorium Fizjologiczne, Miejski Ogród Zoologiczny, ul. Ratuszowa 1/3, 03-461 Warszawa

Obecność i stężenie hormonów, zarówno jajnikowych jak i gonadotropowych, we krwi wyraźnie zmienia się w różnych fazach cyklu płciowego. Oprócz wpływu na narządy rodne hormony te modyfikują w różnym stopniu procesy metaboliczne organizmu m.in. wpływają na poziom wskaźników hematologicznych. Wpływ hormonów płciowych na poziom parametrów hematologicznych badano u norników (1), myszy (15, 16), szczurów (4, 6), świń domowych (17) i ludzi (10, 13, 14). Aktywność seksualna wpływa również na poziom wskaźników hematologicznych (18, 19, 20).

W niniejszej pracy określono przebieg zmian, jakim ulegają w cyklu płciowym podstawowe wskaźniki hematologiczne u trzech podgatunków rodzaju *Sus*, u których równolegle badano zmiany hormonalne zachodzące w cyklu estralnym (7, 8, 9). Celem pracy było określenie ewentualnych prawidłowości w zmianach wskaźników hematologicznych charakterystycznych dla cyklu płciowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na trzech grupach świń: 4 swniach wietnamskich (*Sus scrofa vittatus*), 7 swniach złotnickich pstrych (*Sus scrofa domestica*) oraz pierwszym pokoleniu mieszkańców swni domowej z dzikiem europejskim, cechami zewnętrznymi bardziej przypominającymi dzika (*Sus scrofa domestica* × *Sus scrofa ferrus*) — 2 sztuki.

Do badań użyto zwierząt w wieku 12–14 miesięcy, u których przed badaniami obserwowano 2–3 regularnie powtarzające się ruje. Krew pobierano codziennie, między 8 a 9 rano przez okres przynajmniej jednego cyklu, a jeżeli to było możliwe — przez 2–3 kolejne cykle rujowe, z kaniuli założonej do tętnicy udowej wg metody opisanej przez Weiricha i wsp. (24). Wskaźniki hematologiczne: wskaźnik hematokrytowy (Ht), liczbę czerwonych (RBC) i białych (WBC) krwinek oraz stężenie hemoglobiny (Hb) oznaczano rutynowymi metodami hematologicznymi.

Dla kolejnych dni cyklu wyliczono wartości średnie i błąd średniej arytmetycznej ($\bar{x} \pm m$) poszczególnych wskaźników hematologicznych. Istotność zmian badanych wskaźników między kolejnymi dniami cyklu obliczono testem t-Studenta przy poziomie istotności $p \leq 0,01$.