



ISSN  
1407 – 1754

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE  
VETERINĀRMEDICĪNAS FAKULTĀTE

LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**Dzīvnieki. Veselība.  
Pārtikas higiēna.**

**Animals. Health.  
Food Hygiene.**

**Starptautiskās zinātniskās konferences RAKSTI**  
Jelgava, 2010. gada 29.oktobrī

**International scientific conference PROCEEDING**  
29<sup>th</sup> october, 2010, Jelgava, Latvia

**JELGAVA  
2010**

## **Redkolēģija Editorial Board**

**Henriks Žilinskas**, Dr.habil.med.vet., profesors, Lietuvas Veterinārā akadēmija (Lietuva)

Dr.habil.med.vet., professor, Lithuanian Veterinary Academy (Lithuania)

**Vidmantas Bižokas**, Dr.habil.med.vet., profesors, Lietuvas Veterinārā akadēmija (Lietuva)

Dr.habil.med.vet., professor, Lithuanian Veterinary Academy (Lithuania)

**Edīte Birģele**, Dr.habil.biol., LZA korespondētājlocekle, Latvijas Lauksaimniecības universitāte (Latvija)

Dr.habil.biol., profesor, corresponding member of Latvian Academy of Sciences, Latvian University of Agriculture (Latvia)

**Vita Antāne**, Dr.med.vet., asociētā profesore,  
Latvijas Lauksaimniecības universitāte (Latvija)

Dr.med.vet., assoc.professor, Latvian University of Agriculture (Latvia)

**Aija Ilgaža**, Dr.med.vet., docente,

Latvijas Lauksaimniecības universitāte (Latvija)

Dr.med.vet., Latvian University of Agriculture (Latvia)

Atbildīgais par izdevumu / Responsible for edition **Edīte Birģele**

Izdevuma redaktore / Editor for edition **Līga Kovaļčuka**

Maketētāja / Layout design **Sandra Brande, Solvita Židkova**

Visi krājumā ievietotie raksti ir recenzēti.

All articles are reviewed.

# SATURS

## TABLE OF CONTENTS

PREPARĀTA MILDRONĀTA IEDARBĪBA UZ VAISLAS KUIĻU DZIMUMAKTIVITĀTI UN SPERMAS KVALITĀTI INFLUENCE OF PREPARATION MILDRONAT ON SEXUAL BEHAVIOR AND SEMEN QUALITY OF BOARS <b>Vita Antāne<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>.....</b>	<b>5</b>
MILDRONĀTA IETEKME UZ SAIMNIECISKO VAISLAS GATAVĪBU SASNIEGUŠU KUIĻU ASINS BIOĶĪMISKAJIEM RĀDĪTĀJIEM THE INFLUENCE OF MILDRONATE ON BIOCHEMICAL BLOOD INDICES OF BOARS AFTER REACHING THE BREEDING PREPAREDNESS <b>Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Vita Antāne<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup> .....</b>	<b>12</b>
MILDRONĀTA IEDARBĪBA UZ KUIĻU SĒKLINIEKU MORFOLOĢIJU PĒC SAIMNIECISKĀS VAISLAS GATAVĪBAS SASNIEGŠANAS THE INFLUENCE OF MILDRONATE ON MORPHOLOGY OF BOARS TESTES AFTER REACHING THE BREEDING PREPAREDNESS <b>Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Vita Antāne<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup> .....</b>	<b>18</b>
MĀJAS SUŅU KUŅĢA ĢLOTĀDAS VIRSMAS-BEDRĪŠU EPITĒLIJA MUKOĪDIE EPITELIOCĪTI UN HELIKOBAKTĒRIJU DAUDZUMS KUŅĢĪ MUCOID EPITHELIOCYTES IN THE SUPERFICIAL EPITHELIUM OF THE GASTRIC MUCOSA IN DOMESTIC DOGS AND AMOUNT OF HELICOBACTERIA IN THE STOMACH <b>Dace Bērziņa, Edīte Birģele .....</b>	<b>24</b>
VAISLAS ĶĒVJU ASINS BIOĶĪMISKAJIEM RĀDĪTĀJI DAŽĀDOS TURĒŠANAS APSTĀKĻOS BREEDING MARE BIOCHEMICAL PARAMETERS IN DIFFERENT HOUSING CONDITIONS <b>Inta Caune, Aija Ilgaža .....</b>	<b>29</b>
INOVATĪVA SASTĀVA BROILERCĀĻU GAĻAS IEGUVE OBTAINING OF INNOVATIVE COMPOSITION BROILER CHICKEN MEAT PRODUCTION <b>Sallija Ceriņa, Aleksandrs Jemeljanovs, Vera Krastiņa, Īra Irēna Vītiņa .....</b>	<b>36</b>
LATVIJAS BRŪNĀS ŠĶIRNES GOVJU PIENA MIKROBIĀLĀS PIESĀRŅOTĪBAS VĒRTĒJUMS PĒC TO ĢENĒTISKĀS IZCELSMES LB BOVINE MILK MICROBIAL CONTAMINATION EVALUATION BY RESEARCHING THEIR GENETIC ORIGIN <b>Inese Dūjiņa, Aleksandrs Jemeljanovs, Ināra Helēna Konošonoka .....</b>	<b>43</b>

STRAUSU ( <i>STRUTHIO CAMELUS VAR. DOMESTICUS</i> ) TIEVĀS UN RESNĀS ZARNAS MORFOMETRISKIE RĀDĪTĀJI PERINATĀLAJĀ PERIODĀ MORPHOMETRIC INDICES OF THE SMALL AND LARGE INTESTINE DURING PERINATAL PERIOD IN THE OSTRICH ( <i>STRUTHIO CAMELUS VAR. DOMESTICUS</i> ) <b>Ilmārs Dūrītis, Arnis Mugurēvičs, Lauma Latkovska .....</b>	<b>50</b>
THE EXPERIMENTAL IRON DISORDERS OF THE LIVER AND SMALL INTESTINE <b>Gundega Knipše<sup>1</sup>, Dmitrijs Babarikins<sup>2</sup>, Jurijs Markovs<sup>1</sup>, Nadežda Bērziņa<sup>3</sup>, Alise Grāmatniece<sup>1</sup> .....</b>	<b>56</b>
PĀRTIKAS TOKSIKOINFEKCIJAS IEROSINOŠĀS MIKROFLORAS SASTOPAMĪBA GOVS PIENA IEGUVES UN PIRMAPSTRĀDES PROCESĀ INCIDENCE OF FOODBORN TOXICOINFECTIONS SUGGESTIVE MICROFLORA IN MILKING AND FIRST STAGE TREATMENT PROCESSES <b>Ināra Helēna Konošonoka, Aleksandrs Jemeljanovs, Daina Ikauniece, Gundega Kleina .....</b>	<b>62</b>
STRAUSA GAĻAS KVALITĀTE „ <i>SOUS VIDE</i> ” IEPAKOJUMĀ THE QUALITY OF PACKED OSTRICH MEAT IN „ <i>SOUS VIDE</i> ” <b>Janīna Ķīvīte, Daina Kārklīņa, Irisa Mūrniece .....</b>	<b>68</b>
ENDOMETRIAL HYSTOLOGICAL CHANGES AND PREGNANCY RATES IN MARES IMPAIRED CERVICAL DRAINAGE <b>Evija Liepina, Vita Antane .....</b>	<b>73</b>
STIRNU ( <i>CAPREOLUS CAPREOLUS</i> ) UN STALTBRIEŽU ( <i>CERVUS ELAPHUS</i> ) GAĻAS BAKTERIĀLĀ PIESĀRŅOJUMA NOTEIKŠANA PIELIETOJOT DAŽĀDAS MIKROBIOLOĢIJAS UN MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS METODEDES DETECTION OF BACTERIAL POLLUTION OF ROE DEER'S ( <i>CAPREOLUS CAPREOLUS</i> ) AND RED DEER'S ( <i>CERVUS ELAPHUS</i> ) MEAT USING CLASICAL MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY METHODS <b>Solveiga Liepiņa, Aleksandrs Jemeljanovs, Ināra-Helēna Konošonoka .....</b>	<b>78</b>
SARKOCISTOZE MĀJAS UN MEŽA CŪKĀM SARCOCYSTOSIS OF PIGS AND WILD BOAR <b>Ruta Medne, Anna Krūklīte, Kristīne Šteina .....</b>	<b>82</b>
MĀKSLĪGI RADĪTĀ LAŠU SPURU NEKROZE ARTIFICIAL INDUCED SALMON FIN NECROSIS <b>Ruta Medne, Edgars Liepiņš .....</b>	<b>88</b>
SIERU MIKROFLORAS ANALĪZE ANALYSIS OF CHEESE MICROFLORA <b>Alla Miķelsone, Inga Ciproviča .....</b>	<b>96</b>

RAPŠA RAUŠU IZMANTOŠANAS EKONOMISKIE UN EKOLOĢISKIE FAKTORI STALTBRIEŽU ĒDINĀŠANĀ RAPESEED OIL CAKE USING ECONOMICAL AND ECOLOGICAL FACTORS IN RED DEER FEEDING <b>Līga Proškina, Aleksandrs Jemeljanovs, Īra Irēna Vītiņa, Vera Krastiņa, Biruta Lujāne, Imants Jansons</b> .....	103
ŪDENS AKTIVITĀTE ( $A_w$ ) UN PH KĀ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> RĪSKA RĀDĪTĀJI ŠĶĒLĒS SAGRIEZTIEM GAĻAS PRODUKTIEM WATER ACTIVITY ( $A_w$ ) AND PH AS RISK SHOWING OF <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> IN SLICED MEAT PRODUCTS <b>Indulis Siliņš<sup>1</sup>, Edgars Liepiņš<sup>2</sup></b> .....	110
THE OVARY ACTIVITY IN COWS WITH AND WITHOUT RETAINED FETAL MEMBRANES <b>Santa Skuja, Vita Antāne</b> .....	117
STUDY OF THE MILK PROTEIN GENETIC CHARACTERIZATION IN LATVIAN DAIRY CATTLE BREEDS POPULATIONS <b>Dace Smiltiņa, Andris Bāliņš, Ziedonis Grīslis</b> .....	125
DAŽĀDA JERSĪNIJU SASTOPAMĪBA CŪKU LIEMEŅOS TRĪJĀS KAUTUVĒS LATVIJĀ DIFFERENT PREVALENCE OF YERSINIAE ON PIG CARCASSES IN THREE SLAUGHTERHOUSES IN LATVIA <b>Margarita Terentjeva, Edgars Liepiņš, Aivars Bērziņš</b> .....	130
PERSONALIZĒTA ANTIKOAGULANTU TERAPIJA KARDIOLOĢIJĀ INDIVIDUALIZED ANTICOAGULATION THERAPY IN CARDIOLOGY <b>Inga Urtāne<sup>1</sup>, Jānis Ansabergs<sup>2</sup>, Aina Silvija Štokmane<sup>1</sup>, Dace Bandere<sup>1</sup></b> .....	136
BENZO(A)ANTRACĒNA, BENZO(A)PIRĒNA, BENZO(B)FLUORANTHĒNA UN KRIZĒNA SATURSKŪPINĀTĀ GAĻĀ UN ZIVĪS CONTENT OF BENZO(A)ANTHRACENE, BENZO(A)PYRENE, BENZO(B)FLUORANTHENE AND CHRYSENEIN SMOKED MEAT AND FISH <b>Anda Valdovska<sup>1</sup>, Jānis Mičulis<sup>2</sup>, Ligita Plotiņa<sup>2</sup></b> .....	142
ANIMALS' BEHAVIORAL DATA ANALYSIS BASED ON BEHAVIOR PARAMETERS VISUALIZATION AND FRACTAL DIMENSION METHOD <b>Viktor Veliks<sup>1,2</sup>, Alexander Grakovski<sup>2</sup></b> .....	148
IMUNOGLOBULĪNU SEMIKVANTITĀTĪVO TESTU PIELIETOŠANAS NOZĪME GOVJU GANĀMPULKU VESELĪBAS KONTROLĒ THE IMPORTANCE OF APPLICATION OF IMMUNOGLOBULIN SEMI-QUANTITATIVE TESTS TO CONTROL THE COW HERD HEALTH <b>Māra Viduža<sup>1</sup>, Laima Liepa<sup>2</sup></b> .....	154
TESTING METHODS OF CANINE AND FELINE BLOOD GROUPS COMPATIBILITY IN CLINICAL CONDITIONS <b>Jeļena Andrejeva, Aija Ilgaža</b> .....	160

PRELIMINARY DATA ON TICK-BORNE DISEASES IN DOGS IN LATVIA <b>Inese Berzina, Ilze Matise</b> .....	161
A RAPID EFFECT OF HANDLING ON COUNTS OF WHITE BLOOD CELLS IN A WINTERING PASSERINE BIRD: A MORE PRACTICAL MEASURE OF STRESS? <b>Dina Cirule<sup>1,2</sup>, Tatjana Krama<sup>2</sup>, Jolanta Vrublevska<sup>2</sup>, Indrikis Krams<sup>2</sup></b> .....	162
MICROBIOLOGICAL SECURITY OF APPLES STORED AT MODIFIED ATMOSPHERE <b>Karīna Juhnevica<sup>1</sup>, Gita Skudra<sup>2</sup></b> .....	163
OPPORTUNISTIC PARASITE: <i>TOXOPLASMA GONDII</i> <b>Gunita Deksnē</b> .....	164
DYNAMICS OF <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> COUNTS IN RAW POULTRY MEET DEPENDING ON PACKAGING ATMOSPHERE <b>Kaspars Kovaļenko<sup>1</sup>, Aija Ruzaiķe<sup>2</sup>, Mati Roasto<sup>3</sup>, Edgars Liepiņš<sup>1</sup></b> .....	165
EVALUATION OF THE TEAR PRODUCTION IN DOG FOLLOWING GENERAL ANESTHESIA <b>Līga Kovaļčuka, Artis Bečs, Līga Strode</b> .....	166
CHANGES OF PHYSIOLOGICAL INDICES AFTER RENEWAL OF BALANCED FEEDING OF STARVATING COWS IN THE MAXIMUM PERIOD OF LACTATION <b>Laima Liepa, Ilmārs Dūrītis, Daiga Rudevica</b> .....	167
SEASONAL OUTBREAKS OF TYZZER'S DISEASE IN MALAGASY GIANT JUMPING RATS ( <i>HYPOGEOMYS ANTIMENA</i> ) IN THE RIGA ZOO <b>Ilze Matise<sup>1</sup>, Tatjana Ivasko<sup>2</sup>, Guna Vitola<sup>2</sup>, Arno Wunschmann<sup>3</sup></b> .....	168
RABIES ORAL VACCINATION IN LATVIA – PAST, PRESENT AND FUTURE <b>Edvīns Oļševskis<sup>1</sup>, Edgars Liepiņš<sup>2</sup></b> .....	169
LYMPH NODES' HISTOLOGICAL STATUS OF PIGS WITH PORCINE CIRCOVIRUS-2 <b>Inga Pīnkā, Edīte Birģele<sup>2</sup></b> .....	170

# PREPARĀTA MILDROŅĀTA IEDARBĪBA UZ VAISLAS KUIĻU DZIMUMAKTIVITĀTI UN SPERMAS KVALITĀTI

## INFLUENCE OF PREPARATION MILDROŅAT ON SEXUAL BEHAVIOR AND SEMEN QUALITY OF BOARS

**Vita Antāne<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>2</sup>AS Grindeks

### ABSTRACT

In 1984, the Institute of Organic Synthesis of Latvian Academy of Sciences developed a medical drug Mildronate that is widely used in medicine as anti-ischemic and stress-protective drug in treating various cardiovascular diseases, and in farm animals as growing and metabolic process stimulator. It is known, that Mildronate (Quaterin, Meldonium) interferes with carnitine biosynthesis, controlling carnitine and gamma-butyrobetaine (GBB) concentration ratio. L-carnitine is implicate in reproductive biology and could be associated with the maturation process of spermatogenesis. In its turn, GBB normalizes and stimulates the sexual activity and potency in mammals.

The aim of our study was to estimate the influence of preparation Mildronate on spermatogenesis, *libido* and semen quality of boars. Two groups (control and experimental) of boars were used to achieve the task of the research. Each group consisted of six animals, were kept and fed at the same circumstances. Experimental period started two months later when the boars had reached the breeding preparedness. The boars of experimental group got orally 2 g of Mildronate daily for 60 days. Animals both control and experimental groups on a regular basis were tested for health status as well as the blood samples were taken. The semen was collected manually once every 10 days. The semen quality parameters were assessed before the administration of Mildronate and further once in 39 days that corresponds to the length of spermatogenesis cycle in boars. The sexual behavior was detected for each boar. The results of the study indicate that the administration of Mildronate in boars improves their sexual activity and the semen quality: time from approaching the „dummy” to the start of ejaculation is significantly ( $p < 0.05$ ) reduced and the progressive motility of spermatozoa is significantly increased ( $p < 0.001$ ). In animals that were administered Mildronate the dynamic changes of spermatozoa activity are more even and smoother with every semen collection.

**KEY WORDS:** mildronate, boars, sexual activity, semen quality indices.

### IEVADS

Vaislinieku selekcija, izaudzēšana, to apmācība spermas atdošanai ir liels laika, ieguldītā darba un finansu ietilpīgs process (5). Apgaļošanas procesā ļoti būtiski ir vaislinieku spermas kvalitātes rādītāji, tāpēc pētījumi par atsevišķu preparātu iespējamo pozitīvo iedarbību uz spermatogēnēzi ir zināms ieguldījums šīs problēmas risināšanā. E.Jacyno, A.Kolodziej, M.Kamyczek et al., (2007) apraksta par L-Carnitīna pozitīvo ietekmi uz kuiļu spermatogēnēzi (3) Savukārt Mildronāts, kurš sintezēts Latvijas Organiskās Ķīmijas institūtā, un atļauts lietot humānajā medicīnā sākot ar 1984 gadu,

būtiski samazina L-karnitīna, bet paaugstina  $\gamma$  – butirobetaīna (GBB) koncentrāciju asins plazmā un sēkliniekos. GBB var pielietot seksuālās aktivitātes un potences stimulēšanai(4). Mūsu pētījuma mērķis bija pārbaudīt preparāta Mildronāta ietekmi uz kuiļu spermatoģenēzi un spermas kvalitāti, jo iepriekšējie pētījumi parādīja (1) ka izbarojot Mildronātu 60 dienas pa 2,0 g vaislas gatavību sasniegušiem kuiļiem palielinās spermatoģenēzē epitēlija slāņa biezums, testosterona koncentrācija asins serumā, un labāk attīstās sēklinieku interstīcijs un palielinās glandulocītu (Leidīga šūnu) skaits.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījuma veikšanai no nosacīti analogiem kuiļiem tika komplektēta eksperimentālā un kontroles grupa. Pētījums sastāvēja no diviem periodiem: sagatavošanas un eksperimentālā. Sagatavošanas periodā tika apmācīti 8-9 mēnešus veci kuiļi, kuri sasnieguši vaislas gatavību, atdot spermu uz fantoma. Eksperimentālais periods ilga trīs mēnešus. Šajā laikā kuiļi katru dienu individuāli kopā ar barību saņēma 2 gramus Mildronātu atšķaidītu ar 2-3ml ūdens. Spermas noņemšana veikta manuāli ik pēc 10 dienām. Katram kuilim noteicām dzimumrefleksu (no kuiļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijas sākumam un ejakulācijas ilgumu) izteiktību laika periodā - sekundēs. Pirms Mildronāta saņemšanas un tālāk ik pēc 39 dienām, kas atbilst kuiļu viena spermatoģenēzes cikla garumam, noteicām kuiļiem spermas kvalitātes rādītājus (ejakulāta masu, spermiju koncentrāciju, spermatozoīdu aktivitāti un morfoloģiju). Spermas izmeklējumi tika veikti tūlīt pēc spermas noņemšanas uz vietas fermā. Spermatozoīdu morfoloģijas noteikšanai pagatavotās iztriepes nokrāsotas un izvērtētas Klīniskā institūta Dzīvnieku reprodukcijas laboratorijā.

Iegūto datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm, iegūtajiem rezultātiem aprēķināti vidējie aritmētiskie lielumi, dispersijas, standartnovirzes, izmantojot datoru ar Stata-9 un Microsoft Excel standartprogrammu paketi.

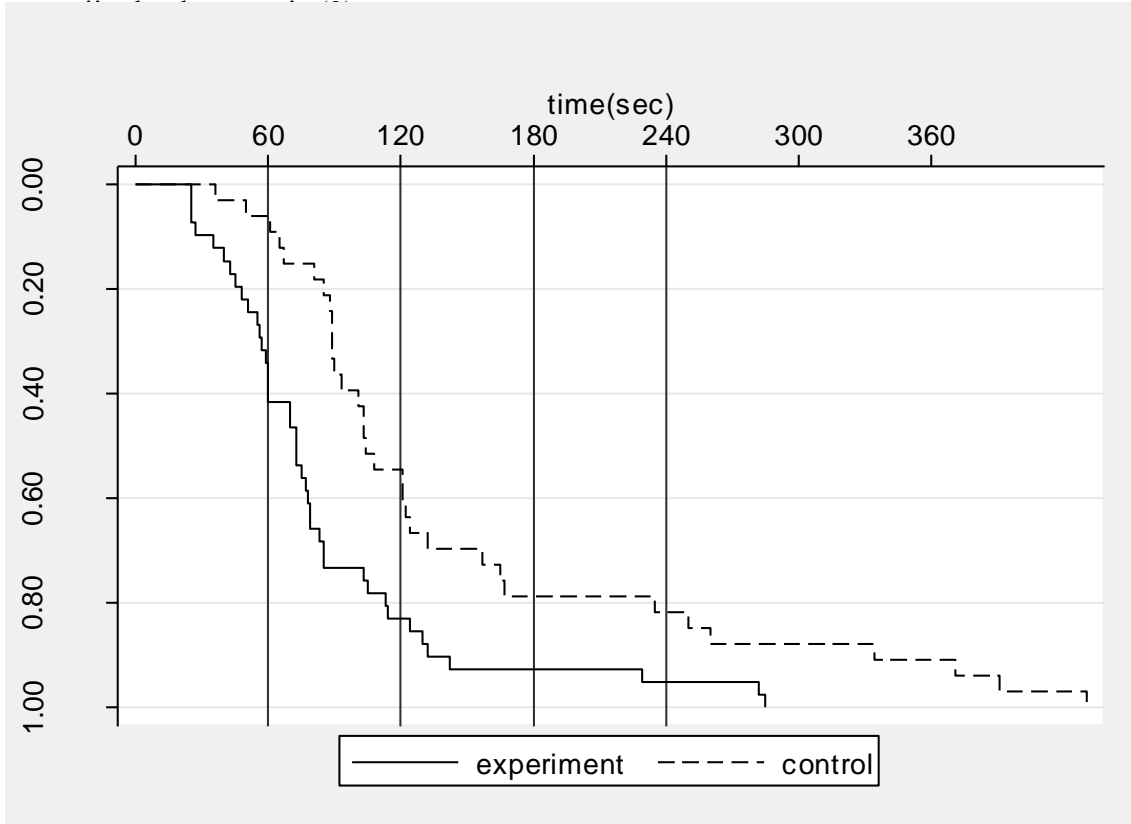
## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Dzimumrefleksu, no kuiļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijai, izteiktība un ejakulācijas ilgums laika vienībā ik pēc 60 s grafiski attēloti izmantojot Kaplan-Meier (6) metodi (1 un 2 attēls). Aprēķini parādīja, ka pēc pirmajām 60 sekundēm 42% no eksperimenta dzīvniekiem (E), kuri saņēma Mildronātu, iestājās ejakulācija. Tajā pat laikā kontroles grupas kuiļiem (K), kuri preparātu nesaņēma, ejakulācija iestājusies tikai 6% gadījumos. Pēc 120 s šie rādītāji ir attiecīgi 83% un 55%, pēc 180 s - 93% un 79%. Atšķirības starp grupām pēc Wilcoxon (Breslow) testa ir būtiskas -  $Pr > \chi^2 = 0,0001$ . Turpretim ejakulācijas ilgums (2 zīm.) eksperimenta grupas kuiļiem būtiski neatšķīrās no kontroles grupas dzīvniekiem un tā vidējie rādītāji bija attiecīgi  $276 \pm 59$  un  $288 \pm 52$  s. Pētījumos ar žurkām (2) pierādījās, ka Mildronāts samazināja brīvā karnitīna koncentrāciju žurku sēkliniekos un tas savukārt nepazemināja žurku seksuālo aktivitāti un spermas kvalitāti.

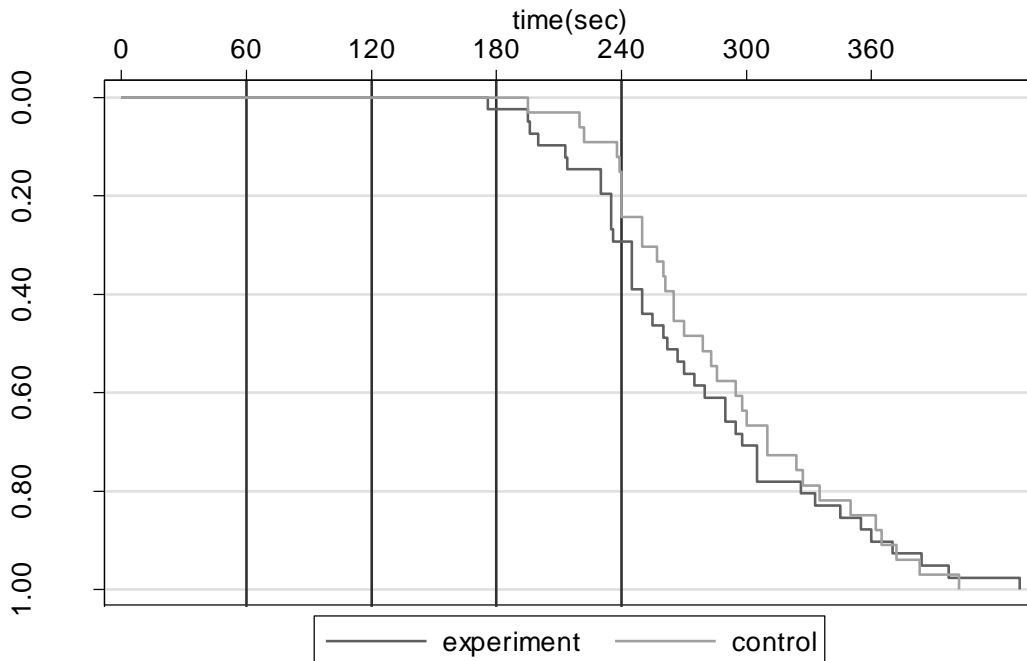
Kuiļu ejakulātu masas rādītāji attēloti 1. tabulā. Pirms Mildronāta pielietošanas eksperimenta un kontroles grupas kuiļu ejakulāta masas rādītāju atšķirības nav būtiskas ( $p > 0,05$ ). Pirmo 39 dienu laikā eksperimentālās grupas kuiļiem pēc Mildronāta pielietošanas palielinās ejakulāta masa no  $120,8 \pm 13,5$  ml līdz  $194,4 \pm 16,1$  (62%). Tai pat laikā kuiļiem, kuri preparātu nesaņēma (kontroles grupa) ejakulāta masas palielinājums nenozīmīgs un tas ir no  $145,8 \pm 24,9$  uz  $157,5 \pm 18,2$  (9%) Rādītāju atšķirības starp grupām ir ar varbūtību  $p < 0,10$ . Vienu spermatoģenēzes ciklu vēlāk (40 ... 79. diena) ejakulāta masas palielinājumu par 41% novēro kontroles grupas kuiļiem un šajā laikā tas līdzinās E grupas kuiļu ejakulāta masai. Arī turpmākajās spermas noņemšanas reizēs



(80...99 diena) ejakulāta masas rādītāji starp E un K grupas kuļiem ir līdzīgi. Mildronāts strukturāli ir radniecīgs karnitīnam (2) un tā L-karnitīna izbarošana kuļiem pozitīvi ietekmēja spermas kvalitāti, jo par 11% palielinājās ejakulāta masa un kopējais



1. attēls. Laiks (s) no kuļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijai



2. attēls. Ejakulācijas ilgums (s)  
Figure 2. The length of ejaculation (sec)

1. tabula/Table 1

**Ejakulāta masa pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļiem, g**  
**The total wight of the ejaculate at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartklūda/standart deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Ejakulāta masa/Total volume of ejaculate (g)		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība
0	6	5	120.8 ± 13.5	145.8 ± 24.9	0.19	
1...39	19	13	194.4 ± 16.1	157.5 ± 18.2	0.073	*
40...79	23	16	198.7 ± 13.9	204.0 ± 23.1	0.42	
80...99	11	6	208.9 ± 15.4	199.5 ± 20.3	0.36	

Spermiju koncentrācijas dinamika kuļū ejakulātā vairāku spermatoģenēzes ciklu ietvaros attēlota 2. tabulā. Pirms Mildronāta pielietošanas spermiju koncentrācijas rādītāju atšķirības starp E un K grupas dzīvniekiem nav būtiskas ( $P > 0,05$ ). Turpinot spermas noņemšanu kuļiem, spermiju koncentrācija ejakulātā palielinās gan eksperimenta, gan kontroles grupas dzīvniekiem, bet atšķirības starp grupām nav būtiskas ( $P > 0,05$ ).

2. tabula/Table 2

**Spermiju koncentrācija pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļiem, milj./ml**  
**The spermatozoa concentration at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars, milj./ml**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartklūda/standart deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Spermiju koncentrācija/spermatozoa concentration, milj./ml		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība
0	6	5	378.3 ± 25.6	337.2 ± 19.0	0.12	-
1...39	19	13	409.2 ± 14.2	395.3 ± 26.7	0.31	-
40...79	23	16	407.7 ± 12.5	416.3 ± 27.0	0.38	-
80...99	11	6	471.0 ± 18.6	441.3 ± 41.4	0.24	-

Spermatozoīdu aktivitātes rādītāji salīdzināti pa spermatoģenēzes periodiem, līdzīgi kā to veicām izvērtējot ejakulāta masas un spermiju koncentrācijas rādītājus. Pirms Mildronāta pielietošanas eksperimenta un kontroles grupas kuļū spermatozoīdu aktivitāte bija zema, attiecīgi  $5,0 \pm 0,9$  un  $4,3 \pm 0,6$  balles (3. tabula). Eksperimenta laikā ar katru nākošo spermatoģenēzes ciklu kuļiem novēro spermatozoīdu aktivitātes palielināšanos. Salīdzinot savā starpā E un K grupas dzīvniekus redzam, ka E grupas kuļiem, kuri saņēma Mildronātu spermatozoīdu aktivitāte jau pēc pirmā spermatoģenēzes cikla sasniedz 7 balles, kas atbilst kuļū spermas atšķaidīšanas un cūku

mākslīgās apsēklošanas standartam un tāda paliek visu eksperimenta laiku. Tai pat laikā kontroles grupas kuļļu vidējā spermatozoīdu aktivitāte ejakulātā nesasniedz 7 balles un ir būtiski zemāka ( $p < 0,01$ ) kā eksperimenta grupas dzīvniekiem. Jāatzīmē, ka no eksperimenta 6 kuļļiem sākot ar 40 dienu pēc Mildronāta pielietošanas iegūti 34 ejakulāti, no kuriem 25 (73%) novērtēti ar 7 un vairāk ballēm un tie ir izmantojami spermas atšķaidīšanai un cūku mākslīgai apsēklošanai. Attiecīgi no kontroles grupas 4 kuļļiem iegūti 22 ejakulāti, no kuriem tikai 8 (36%) izmantojami cūku mākslīgajā apsēklošanā.

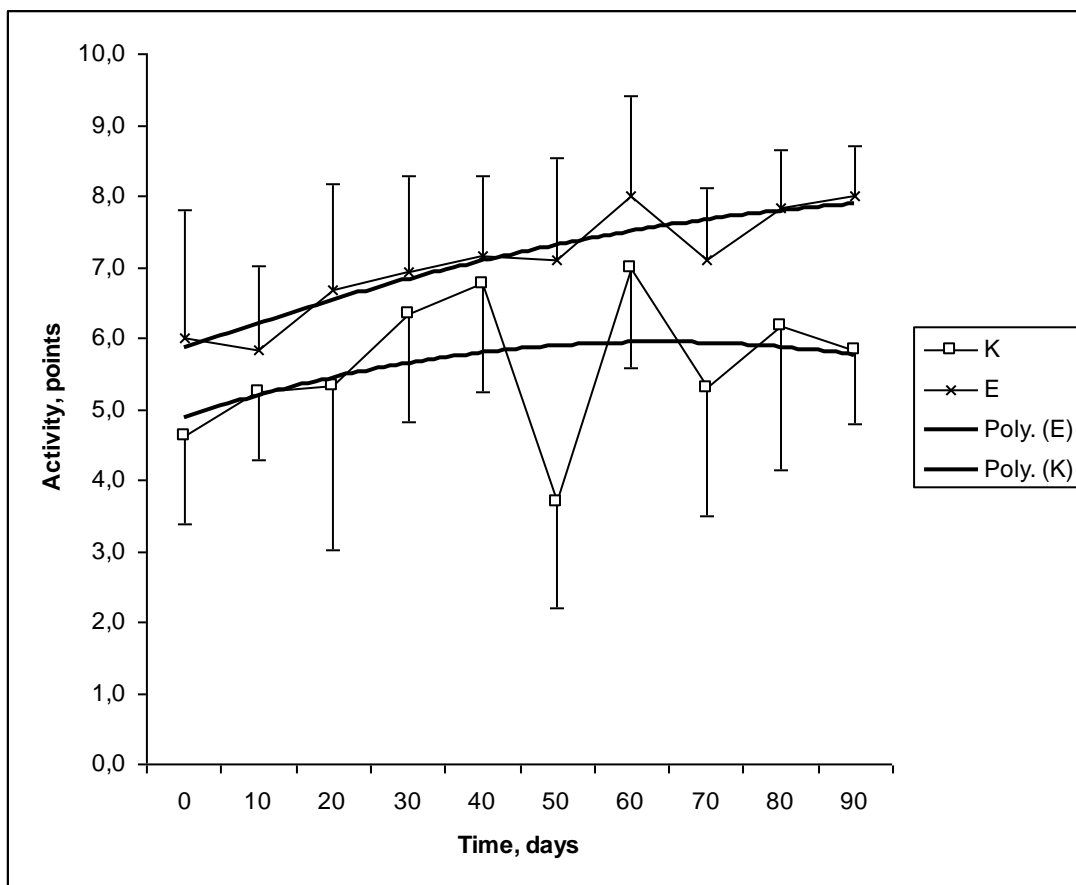
3. tabula/Table 3

**Spermatozoīdu aktivitāte pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļļiem/**

**Progressive motility of the spermatozoa at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartkļūda/standard deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Aktivitāte, balles / motility, points		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība/significance
0	6	5	$5.0 \pm 0.9$	$4.3 \pm 0.6$	0.27	-
1...39	19	13	$6.6 \pm 0.3$	$5.4 \pm 0.5$	0.019	**
40...79	23	16	$7.3 \pm 0.3$	$5.6 \pm 0.5$	0.0017	***
80...99	11	6	$7.9 \pm 0.2$	$6.0 \pm 0.6$	0.0012	***



3. attēls. **Spermatozoīdu vidējā aktivitāte kuļiem, kuri saņēma Mildronātu un kontroles grupas kuļiem, kuri Mildronātu nesaņēma**

Figure 3. **The average spermatozoa motility in boars which were administrated Mildronate and control group**

Izvērtējot eksperimenta un kontroles grupas kuļļu spermiju aktivitātes vidējo rādītāju dinamiku pa atsevišķām spermatozoju noņemšanas reizēm (3 attēls) redzam, ka spermatozoju aktivitātes svārstības ir vērojamas vienlaicīgi gan eksperimenta, gan kontroles grupas kuļļiem. Tomēr jāatzīmē, ka dzīvnieki, kuri saņēma Mildronātu spermatozoju aktivitātes dinamiskās izmaiņas pa spermatozoju noņemšanas reizēm ir vienmērīgākas un izlīdzinātākas. Līdzšinējie pētījumi (7,9,10) liecina, ka Mildronāts (kvaterīns) pozitīvi ietekmē teļiem un sivēniem barības vielu uzsūkšanos zarnu traktā, uzlabo aminoskābju vielmaiņu un darbojas kā adaptogēns, mazinot sivēnu atšķiršanas stresu. Pētījumi ar cāļiem (8) parādīja, ka kvaterīns ir dzīvo šūnu augšanas stimulators un nedarbojas citotoksiski. Minēto pētījumu rezultātus var saistīt ar Mildronāta pozitīvo ietekmi uz kuļļu noturību pret stresu un aminoskābju vielmaiņu, kas ne tikai uzlaboja spermatozoju aktivitāti, bet mazināja tās svārstības starp atsevišķām spermatozoju noņemšanas reizēm.

## SECINĀJUMI

1. Preparāta Mildronāta pielietošana vaislas kuļļiem pozitīvi uzlabo dzimumrefleksu aktivitāti un spermatozoju kvalitāti: būtiski samazinās laiks no kuļļu tuvošanās fantomam līdz ejakulācijas sākumam ( $p < 0.05$ ) un būtiski paaugstinās spermatozoju aktivitāte ( $p < 0.001$ ).

2. Dzīvniekiem, kuri saņēma Mildronātu spermatozoīdu aktivitātes dinamiskās izmaiņas katrā spermas noņemšanas reizē ir vienmērīgākas un izlīdzinātākas.

#### LITERATŪRA

1. Auzāns, A., Brūveris, Z., Rimeicāns, V., Antāne, M., Mangale, J., Mednis, I., Lūsis, I., Stonāns (2010) Mildronāta iedarbība uz kuiļu sēklinieku morfoloģiju pēc saimnieciskās vaislas gatavības sasniegšanas // Veterinārmedicīnas raksti. 2010.
2. Dambrova, M., Cīrule, H., Svalbe, B., Zvejniece, L., Pugovichs, O., Zorenko, T., Kalviņš, I., Liepiņš, E., Belozerova I. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // Physiology & Behavior 2008; 95, 341-347.
3. Jacino, E. et al Effect of L-Carnitine Supplementation on Boar Semen Quality // Acta.vet.Brno, .2007; 76:595-600.
4. Kalvinsh, I., Veveris, M., Birmans, A. Pharmaceutial composition comprising gammabutirobetaine for stimulating the sexual activity and potency;,.WO/2003/022263[WO/2003/022263]. Ref. Type: Patent.
5. Stira, A., Nudiens, J., Veide, Dz., Konošonoka, I.-H. Cūku reprodukcijas procesu pētījumi un to optimizācijas iespējas // Starptautiskā zinātniskā konference „Dzīvnieki.Veselība. Pārtikas higiēna.”, 2002; Jelgava: 266-271
6. Veterinary epidemiologic research 2nd Edition Jan Dohoo, Wayne Martin, Henrich Stryhn /Published by VER Inc. Charlottetown · Prince Edward Island · Canada. Second printing January 2010; 475 – 476.
7. Клинская, М. М., Романов, В. Н. Влияние кватерина на пищеварение у телят // В кн.: Комбикорма, премиксы и добавки. Дубровники: 1985; 60-63.
8. Курашвили, Б. Е., Калвиньш, Я. И., Квинихадзе, С. Г., Кобахидзе, Л. Т., Минкеладзе, Л. Г., Чумбуридзе, С. Р. Результаты пищеварительных испытаний на цыплят стимулятора «кватерина» // Известия академии наук СССР, серия «Биология», 1983;. 9. : 4:142-149.
9. Романов, В. И. Процессы пищеварения и продуктивность телят при использовании кватерина в рационах // Авиореферат дисс...канд. вет. наук, Дубровники: 1987; 1 – 23
10. Тауритис, А. К., Андерсон, П. П., Бузлама, В. С., Калвиньш, И. Я. Применение кватерина для направленного изменения реакций поведения поросят при отъёмном стрессе // Тезисы докладов научной конференции, Елгава: 1984; 22 – 24

# MILDONĀTA IETEKME UZ SAIMNIECISKO VAISLAS GATAVĪBU SASNIEGUŠU KUIĻU ASINS BIOĶĪMISKAJIEM RĀDĪTĀJIEM

## THE INFLUENCE OF MILDRONATE ON BIOCHEMICAL BLOOD INDICES OF BOARS AFTER REACHING THE BREEDING PREPAREDNESS

Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Vita Antāne<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija  
Faculty of Veterinary Medicine, LUA, Latvia

<sup>2</sup> AS Grindeks

### ABSTRACT

The aim of the study was to find out the influence of preparation Mildronate (Quaterin, Meldonium) on a number of biochemical indices of boars blood after reaching the breeding preparedness. Mildronate was developed by the Institute of Organic Synthesis of Latvian Academy of Sciences. Two groups (control and experimental) of boars were used to achieve the task of the research. Each group of 6 animals were kept and fed at the same circumstances. Experimental period started two month later when the boars had reached the breeding preparedness. The boars of experimental group daily got orally 2 g of Mildronate 60 days. Animals both control and experimental groups on a regular basis were tested for health status as well as the blood samples were taken. The results of our study indicate that levels of testosterone in the blood of boars of the Mildronate group increased statistically significantly. Other blood biochemical characteristics did not differ between groups and corresponded to porcine physiological norm.

**KEY WORDS:** mildronate, boars, biochemical indices of blood, testosterone.

### IEVADS

Mūsu pētījuma mērķis bija noskaidrot, kā Mildronāts (Kvaterīns, Meldonijs) ietekmē vaislas gatavību sasniegušo kuiļu asins bioķīmiskos parametrus, jo iepriekšējais pētījums (2) parādīja, ka 2.0 g Mildronāta izbarošana vaislas gatavību sasniegušiem kuiļiem 60 dienas pozitīvi ietekmēja sēklinieku morfoloģiju: tika novērota tendence palielināties sēklinieku masai, tilpumam. Arī histoloģiskie pētījumi parādīja, ka Mildronāta ietekmē palielinās spermatogēnā epitēlija slāņa biezums, labāk attīstās sēklinieku interstīcijs ar intersticiālajiem glandulocītiem (Leidiga šūnām) un asinsvadi.

### MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījuma veikšanai no nosacīti analogiem saimniecisko vaislas gatavību sasniegušiem kuiļiem, kas jau bija apmācīti atdot spermā uz fantoma, tika komplektēta eksperimentālā un kontroles grupa, katrā pa 6 dzīvniekiem. Sākot kuiļu apmācību spermas atdošanai, tie tika izvietoti katrs savā aizgaldā un baroti atbilstoši vecumam. Eksperimentālās grupas kuiļi, sākot ar 280 dienu vecumu, saņēma 2.0 g Mildronāta vienu reizi dienā, sajauktu kopā ar sauju sausās barības 60 dienas ilgi. Kontroles grupas kuiļi preparātu nesaņēma. Eksperimenta laikā abu grupu kuiļiem

eksperimenta sākumā un beigās no v. *saphena medialis* laikā no 12<sup>00</sup> līdz 13<sup>00</sup> tika ņemti asinis paraugi, tie attiecīgi sagatavoti un nogādāti laboratorijās. Asins sērumā tika noteikta kreatinīna, kopējā holesterīna, kopējā bilirubīna, glikozes, testosterona koncentrācija un ASAT, ALAT aktivitāte.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Asins bioķīmiskie rādītāji izmēģinājuma un kontroles grupas dzīvniekiem eksperimenta sākumā atspoguļoti 1. tabulā, bet eksperimenta beigās – 2. tabulā.

1. tabula/Table 1

### Asins bioķīmiskie rādītāji eksperimentālās un kontroles grupas kailiem eksperimenta sākumā

### Biochemical indices of boars blood of experimental and control groups at the beginning of trial

Kuiļu ident.Nr. / Boar identification	Grupa E/K / Group E/K	Kreatinīns/ Creatinine, mkno/l	Bilirubīns/ Total bilirub., mkmol/l	Holesterīns/ Cholesterol, mmol/l	Glikoze / Glucose mmol/l	ASAT, IU/l	ALAT, IU/l
4015	E	242	2.40	1.54	4.90	46	42
4043	E	199	3.30	1.58	3.80	41	55
4042	E	240	3.60	1.82	4.40	31	44
5256	E	173	2.70	2.00	3.80	32	56
5253	E	261	2.70	1.76	4.60	52	52
4047	E	224	2.70	1.54	4.80	28	43
Vid.aritm. / Mean arithm.		223.17	2.90	1.71	4.38	38.3	48.7
Stand.nov. / Standard dev.		32.16	0.45	0.19	0.48	9.5	6.4
Stand.kļūda / Standard error		13.13	0.18	0.08	0.20	3.9	2.6
CI (95%)*		189.4... 256.9	2.43...3.37	1.51...1.90	3.88...4.89	28.3... 48.3	42.0...5 5.4
4045	K	229	3.30	1.76	4.20	58	56
5258	K	176	2.70	1.71	4.80	31	68
4048	K	177	2.40	1.57	3.90	39	57
4046	K	309	2.70	2.28	4.20	39	50
5266	K	163	1.50	1.49	4.50	45	57
5255	K	226	2.10	1.69	3.90	54	52
Vid.aritm. / Mean arithm.		213.33	2.45	1.75	4.25	44.3	56.7
Stand.nov. / Standard dev.		54.42	0.61	0.28	0.35	10.2	6.3
Stand.kļūda / Standard error		22.22	0.25	0.11	0.14	4.1	2.6
CI (95%)*		156.2... 270.4	1.81...3.09	1.46...2.04	3.88...4.62	33.7... 55.0	50.1... 63.2
p-vērtība / p-value		0.36	0.09	0.38	0.30	0.16	0.03
Nozīmīgums / Significance		-	-	-	-	-	+

\*Vidējā aritmētiskā 95% ticamības intervāls / 95% confidence interval of the arithmetic mean

**Asins bioķīmiskie rādītāji eksperimentālās un kontroles grupas kuiļiem  
eksperimenta beigās**

**Biochemical indices of boars blood of experimental and control groups  
at the end of trial**

Kuiļu ident.Nr. / Boar identification	Grupa E/K / Group E/K	Kreatinīns / Creatinine, mknol/l	Bilirubīns / Total bilirub., mkmol/l	Holesterīns / Cholesterol, mmol/l	Glikoze / Glucose mmol/l	ASAT, IU/l	ALAT, IU/l
4015	E	140	1.50	1.38	4.90	37	62
4043	E	204	2.30	1.31	3.80	25	54
4042	E	143	2.10	1.78	4.40	22	62
5256	E	191	2.30	1.46	3.80	32	52
5253	E	205	2.60	1.16	4.60	34	53
4047	E	104	2.70	0.93	4.80	31	59
Vid.aritm. / Mean arithm.		164.5	2.25	1.34	4.38	30.2	57.0
Stand.nov. / Standard dev.		41.5	0.43	0.29	0.48	5.6	4.6
Stand.kļūda / Standard error		17.0	0.17	0.12	0.20	2.3	1.9
CI (95%)*		120.9... 208.1	1.80...2.70	1.04...1.64	3.88...4.89	24.3... 36.1	52.2... 61.8
4045	K	183	1.20	1.41	5.20	34	66
5258	K	155	1.50	1.25	4.50	38	73
4048	K	133	1.50	1.31	4.60	36	60
4046	K	214	2.30	0.92	4.50	42	52
5266	K	163	2.30	1.66	4.00	34	56
5255	K	140	1.50	1.77	4.40	22	74
Vid.aritm. / Mean arithm.		164.7	1.72	1.39	4.53	34.3	63.5
Stand.nov. / Standard dev.		29.9	0.47	0.30	0.39	6.7	9.0
Stand.kļūda / Standard error		12.2	0.19	0.12	0.16	2.8	3.7
CI (95%)*		133.3... 196.1	1.23...2.21	1.07...1.71	4.13...4.94	27.3... 41.4	54.0... 73.0
p-vērtība / p-value		0.50	0.03	0.39	0.28	0.14	0.07
Nozīmīgums / Significance		-	+	-	-	-	-

\*Vidējā aritmētiskā 95% ticamības intervāls / 95% confidence interval of the arithmetic mean

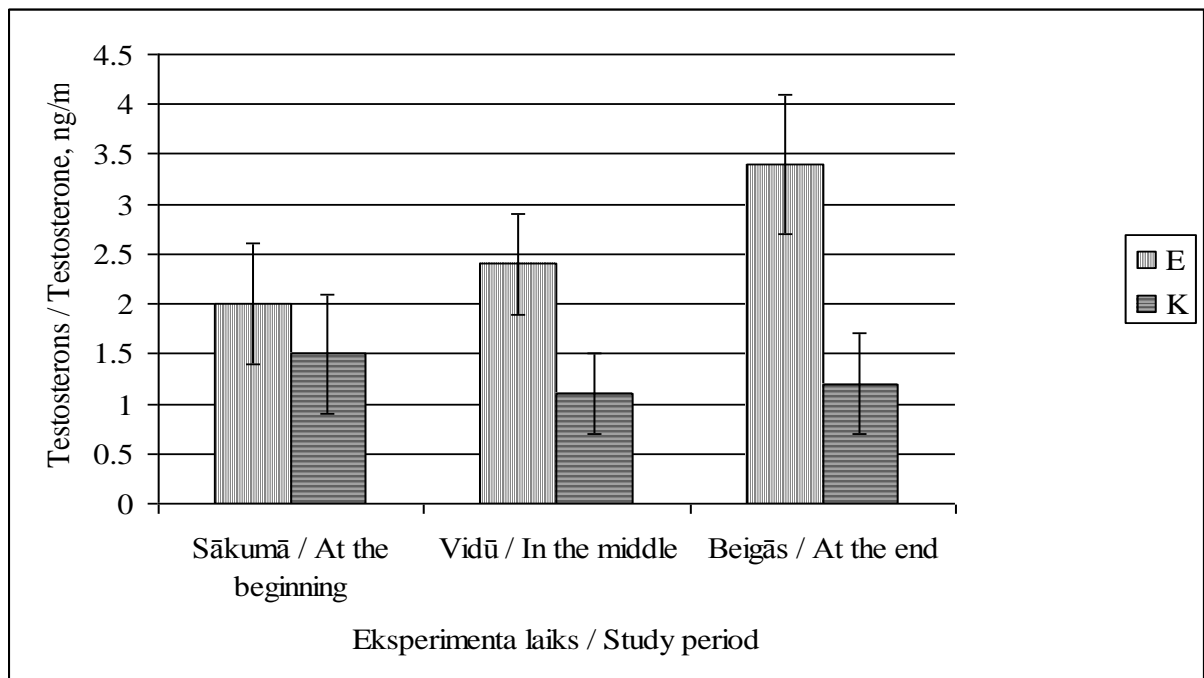
Kā redzams 1. un 2. tabulā, abu grupu dzīvniekiem kreatinīna, kopējā bilirubīna, kopējā holesterīna, glikozes koncentrācija un ASAT, ALAT aktivitāte neuzrāda būtiskas atšķirības un atbilst šīs sugas dzīvnieku fizioloģiskajiem rādītājiem. Atšķirības vērojamas testosterona koncentrācijā (skat. 3. tabulu un 1. att.). Šīs tabulas mērījumu analīze rāda, ka eksperimentālās grupas kuiļiem testosterona koncentrācija asinīs pētījuma laikā ir būtiski palielinājusies, bet kontroles grupas dzīvniekiem tā nav mainījusies.



**Testosterona dinamika asins sērumā eksperimentālās (E)  
un kontroles (K) grupas kuļiem**  
**Dynamics of the testosterone in boars blood in control (K) and  
experimental (E) groups, ng./ml**

Pētījuma laiks Study time	Mērījumu skaits Number of measurements		Testosterona koncentrācija, ng/ml Conc. of testosterone ng/ml		Atšķirību nozīmīgums The importance of distinction	
	E	K	E	K	p-vērtība / p-value	Būtiskums / Significance
Eksperimenta sāk. At the beginn. of trial	4	6	2,0 ±0,6	1,5 ± 0,6	0.55	-
Eksperimenta vidū Middle of trial	6	6	2,4 ±0,5	1,1±0,4	0.05	*
Eksperimenta beigās At the end of trial	6	6	3,4 ± 0,7	1,2 ± 0,5	0.03	**

p<0.10\*; p<0.05\*\*; p<0.01\*\*\*



1. attēls. **Testosterona dinamika eksperimentālās (E) un kontroles (K) grupas kuļiem**

Figure 1. **Dynamics of blood testosterone concentrations in experimental (E) and control (K) groups of boars**

Mūsu pētījums liecina, kā Mildronāts stimulē testosterona sintēzi kuiļu intersticiālajos glandulocītos (Leidiga šūnās). Saskaņā ar (3) novērojumiem, paaugstināts testosterona līmenis pozitīvi ietekmē kuiļu augšanu un to spermas produkciju, kaut arī daži autori to neatzīst (14).

Kā liecina literatūras dati, testosterona biosintēze ir ģenētiski kontrolēta (10), bet tā līmeni asinīs ietekmē arī rinda citu faktoru: dzīvnieka vecums (13,15), diennakts ritmika (5,7), ēdināšana (9), kā arī dažādas bioloģiski aktīvas vielas (1,4,8,9,12). Dažas no šīm vielām, piemēram, aromatozes inhibitors letrozols (1) un ārējais testosterons darbojas stimulējoši (4), bet 2-ethylhexyl ftalāts, estradiola benzoāts, tryfeniltins un tributylins nomāc testosterona biosintēzi (8,12). Visi minētie dati, ka arī mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka testosterona līmenis asinīs ir ietekmējams.

Al-Taras, Eeman Elsidning (1) aromatāzes inhibīciju ar letrozolu, kas paaugstina testosterona produkcijas līmeni kuiļu intersticiālajos glandulocītos (Leidiga šūnās), iesaka pielietot kuiļu reproduktīvo spēju uzlabošanai. Arī mūsu pētījums rāda, ka Mildronāts varētu būt iedarbīgs līdzeklis kuiļu testosterona deficīta gadījumos.

Mildronāta stimulējošās iedarbības pamatā uz testosterona sintēzi kuiļu sēkliniekos varētu būt vairāki fizioloģiski mehānismi: 1) mildronāts, iedarbojoties uz sēklinieku mikrocirkulācijas sistēmu, uzlabo to audu trofiku, par ko liecina vairāki pētījumi par analoga preparāta kvaterīna iedarbību uz citiem orgāniem (16,17,18); 2) Mildronāts paaugstina gammabutirobetaīna koncentrāciju asinīs, bet šis savienojums pēc (6) datiem stimulē seksuālo aktivitāti; 3) iespējams, ka Mildronāts uzlabo aerobo vielmaiņu sēklinieku audos, kā to P. Mustafins (11) novērojis muskuļos.

## SECINĀJUMI

1. Izbarojot saimniecisko vaislas gatavību sasniegušiem eksperimentālās grupas kuiļiem 60 dienas Mildronātu pa 2.0 g dienā kopā ar barību, eksperimentālās grupas kuiļiem testosterona koncentrācija asinīs palielinājās statistiski ticami, kamēr kontroles grupas dzīvniekiem tā nemainījās.
2. Mildronāta izbarošana eksperimentālās grupas kuiļu asinīs neietekmēja kreatinīna, kopējā bilirubīna, kopējā holesterīna, glikozes koncentrāciju un ASAT, ALAT aktivitāti, salīdzinājumā ar kontroles grupas dzīvniekiem un šie rādītāji eksperimenta beigās atbilda sugas fizioloģiskajiem parametriem.

## LITERATŪRA

1. Al-Taras, Eeman Elsidning. The role of endogenous estrogen in the regulation of reproductive function in the developing boar. University of California, Davis, 2005: 93 p.
2. Auzāns, A., Brūveris, Z., Rimeicāns, J., Antāne, V. Mangale, M., Mednis, J., Lūsis, I., Stonāns, I. Mildronāta iedarbība uz kuiļu sēklinieku morfoloģiju pēc saimnieciskās vaislas gatavības sasniegšanas // Veterinārmedicīnas raksti. 2010.
3. Bender, J. M., See, M. T., Hanson, D. J., Lawrence, T. E., Cassady, J. P. Correlated response in growth, carcass, and meat quality traits to divergent selection for testosterone production in pigs // J. Anim. Sci. Savoy: Jun. 2006, v. 84 (6):1331-1337.
4. Claus, R., Hausler, S., Lacorn, M. Rise of testosterone, nortestosterone, and 17 beta-estradiol concentration in peripheral plasma of pigs after sublingual application in vivo // Food and Chemical Toxicology. Elsevier, Oxford, UK: 2007, 45: 225-228.
5. Edqist, L. E. Diurnal variations in peripheral plasma levels of testosterone, androsterons, and cortisol in boars // Acta vet. scandinavia, 1980, v. 21 (3): 451-453.

6. Kalvinsh, I., Veveris, M., Birmans, A. Pharmaceutial composition comprising gammabutirotobetaine for stimulating the sexual activity and potency; 2003,.WO/2003/022263[WO/2003/022263].Ref.Type:Patent.
7. Kattesh, H. G. Daily alterations in plasma testosterone in boars at diffent ages //Theriogenology, July 1982. v. 18 (1): 113-118.
8. Ljungvall, K., Karlsson, P., Hulten, F. Madej, A., Norrgren, L., Einarsson, S. Rodrigez-Martinez, H., Magnusson, U. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular mophology by intramuscular low-dose di (2-ethylhexyl) phtalate or estradiol bensoate in the prepubertal boar // Theriogenology. Elsevier, Nevv York, USA: 2005, 64 (5): 1170-1184.
9. Louis, G. F. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations // J. Anim. Sci., Aug, 1994; 72 (8): 2038-2050.
10. Lubritz, D. Genetic parametrs for testosterone production in boars // J. Anim. Sci. Aug. 1991; 69(8): 3220-3224.
11. Mustafins, P. Anaerobās slodzes sekas// Ž. Doctus, jūnijs, 2010: 34-38.
12. Ohno, S. Nakajima, Y. Nakajin, S. Trifenyltin and tributyltin inhibit pig testicular 17 beta-hydroxysteroid dehidrogenase activiry and supress testicular testosterone biosynthesis // Steroids. Elsevier, New York, USA: 2005; 70 (9): 645-651.
13. Gray, R.C. Testosterone Ievels of boars at varieous ages // J. Anim. Sci., July 1971; 33 (1):124-126.
14. Walker, S. Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars // J. Anim. Sci., Aug. 2004; 82 ( 8): 2259-2263.
15. Zamaratskaia, G. Babol, J., Madej, A., Squires, A., Lundstrom, K. Age-related variation of plasma concentrations of scatole, androsterone, testosterone, oestradiol-17 beta oestrone sulphate, dehdroepiandrosterone sulphate, trijodothronine and IGF-1 in six entire male pigs // Reproduction in Domestic Animals. Blackvvell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, Germanv: 2004; 39 (3): 168-172.
16. Клинская, М. М., Романов, В. Н. Влияние кватерина на пищеварение у телят // В кн.: Комбикорма, премиксы и добавки. Дубровники: 1985; 60-63.
17. Курашвили, Б. Е., Калвинын, Я. И., Квинихадзе, С. Г., Кобахидзе, Л. Т., Минкеладзе, Л. Г., Чумбуридзе. С. Р. Результаты пищеварительных испытаний на цыплят стимулятора «кватерина» // Известия академии наук СССР, 1983; серия «Биология», 9: 4:142-149.
18. Романов, В. И. Процессы пищеварения и продуктивность телят прииспользовании кватерина в рационах // Автореф. дисс. канд. вет. наук, Дубровники: 1987; 1-23.

# MILDRONĀTA IEDARBĪBA UZ KUIĻU SĒKLINIEKU MORFOLOĢIJU PĒC SAIMNIECISKĀS VAISLAS GATAVĪBAS SASNIEGŠANAS

## THE INFLUENCE OF MILDRONATE ON MORPHOLOGY OF BOARS TESTES AFTER REACHING THE BREEDING PREPAREDNESS

Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Jāzeps Rimeicāns<sup>1</sup>, Vita Antāne<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

Faculty of Veterinary Medicine, LUA, Latvia

<sup>2</sup> AS Grindeks

### ABSTRACT

The aim of the study was to estimate the influence of preparation Mildronate (Quaterin, Meldonium) on morphology of boars' testes after reaching the breeding preparedness. Mildronate was developed by the Institute of Organic Synthesis of Latvian Academy of Sciences. Two groups (control and experimental) of boars were used to achieve the task of the research. Each group of 6 animals were kept and fed at the same circumstances. Preparatory period lasted from weaning (21-28 day) until they reached the puberty and then the training of boars for collection of semen was started. Experimental period started two month later when the boars had reached the breeding preparedness. The boars of experimental group daily got orally 2,0 g of Mildronate 60 days. Animals both control and experimental groups on a regular basis were tested for health status as well as the blood and semen samples where taken. At the end of the experiment both groups of boars were euthanized following the study of testes (mass,volume) as well as histological research.

Analysis of studies showed in boar's testes of the experimental group there was tendency of increase of testes mass and volume. Histological studies showed an increase the thickness of spermatogeny epithelium and considerably more interstitial glandulocytes (Leydig cells) in comparison with the animals of the control group.

**KEY WORDS:** mildronate, boars, testes, morphometry, histology.

### IEVADS

Postnatālajā ontogēnēzē turpinās sēklinieku augšanas un nobriešanas procesi. Šajā laikā ievērojami palielinās sēklinieku masa, kā arī notiek stromas un parenhīmas tālāki diferenciācijas procesi. Ņemot vērā, ka Latvijas Zinātņu akadēmijas Organiskās sintēzes institūtā sintezētais preparāts Mildronāts (Kvaterīns, Meldonijs) darbojas kā šūnu augšanas stimulators un pozitīvi ietekmē kā aminoskābju, tā arī enerģētisko vielmaiņu (4,7,8,9), izvirzījām uzdevumu noskaidrot, kā šis preparāts ietekmē sēklinieku morfofunkcionālo stāvokli kuiļu postnatālās attīstības periodā pēc saimnieciskās vaislas gatavības sasniegšanas. Vienlaicīgi tika kontrolēti arī kuiļu asins bioķīmiskie rādītāji, seksuālā funkcija un spermas kvalitāte.\*

---

\* Asins bioķīmiskās izmaiņas, kuiļu seksuālā aktivitāte un spermas kvalitāte tiks apskatīta atsevišķās publikācijās.

## **MATERIALS UN METODIKA**

Pētījuma veikšanai no nosacīti analogiem kuilīšiem tika komplektēta eksperimentālā un kontroles grupa, ar aprēķinu, lai, uzsākot preparāta izbarošanu, katrā no tām būtu ne mazāk kā 6 dzīvnieki. Pētījums sastāvēja no diviem periodiem – sagatavošanas un eksperimentālā. Sagatavošanas periods ilga no sīvēnu atšķiršanas (21-28 dienu vec.) līdz fizioloģiskās vaislas gatavības iestāšanās laikam un kuilīšu pieradināšanai atdot spermu uz fantoma. Sākot kuiļu apmācības periodu, tie tika izvietoti atsevišķos aizgaldos. Eksperimentālais periods sākās pēc tam, kad kuiļi bija apmācīti atdot spermu uz fantoma un tiem bija iestājusies saimnieciskā vaislas gatavība (248-279 dienu vecumā). Eksperimentālās grupas kuiļi, sākot ar 280 dienu vecumu saņēma 2,0 g Mildronātu vienu reizi dienā, sajauktu kopā ar sauju sausās barības 60 dienas ilgi. Preparāta izbarošana tika veikta individuāli katram dzīvniekam un stingri sekots, lai tie saņemtu paredzēto devu. Kontroles grupas kuiļi preparātu nesaņēma. Eksperimentālā perioda laikā reizi mēnesī abu grupu kuiļi tika svērti, un noteikti hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji. Eksperimentālā perioda beigās kuiļi eitanazēti. Izņemtiem sēkliniekiem noteikta masa un tilpums, kā arī veikta histoloģiskā izmeklēšana. Histoloģiskie izmeklējumi veiktizdarīti Rīgas P. Stradiņa Medicīnas akadēmijas Patoloģijas institūtā.

## **PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

### **SĒKLINIEKU MORFOMETRIJA**

Labā un kreisā sēklinieka svēršanas un tilpuma noteikšanas rezultāti atspoguļoti 1. tabulā. To analīze rāda, ka eksperimentālās grupas dzīvnieku kā labo tā kreiso sēklinieku vidējā masa ir lielāka, salīdzinot ar kontroles grupas kuiļu sēkliniekiem (eksperimentālajai grupai attiecīgi 432.6 g un 440.8 g, bet kontroles grupai – 406.0 un 422.0 g). Abās grupās kreisais sēklinieks svēra vairāk. Arī sēklinieku vidējie tilpumi eksperimentālās grupas kuiļiem ir lielāki. Eksperimentālās grupas kuiļu labā sēklinieka vidējais tilpums sastāda 414 ml un kreisais 420 ml, bet kontroles grupā – labais sēklinieks ir tikai 378.0 ml, bet kreisais – 384 ml liels. Atšķirības nav statistiski ticamas, tomēr kā sēklinieku masas, tā tilpuma palielināšanās tendence vērojama.

Kā redzams 1. att., eksperimentālās grupas kuiļu sēklinieku masas un tilpuma rādītāji ir izlīdzinātāki, jo uzrāda mazākas individuālās svārstības.

Sēklinieku izmēru – masas un tilpuma palielināšanās, ņemot vērā literatūrā satopamos datus (2.5), ļauj prognozēt, ka arī spermas apjoms eksperimentālās grupas kuiļiem būs augstāks, jo P. L. Senger (6) skaidri norāda, ka pastāv cieša pozitīva korelācija starp sēklinieku lielumu un to spēju producēt spermu.

**Sēklinieku morfometrija pēc kuīļu eitanāzijas**  
**Morphometry of testes after boars euthanasia**

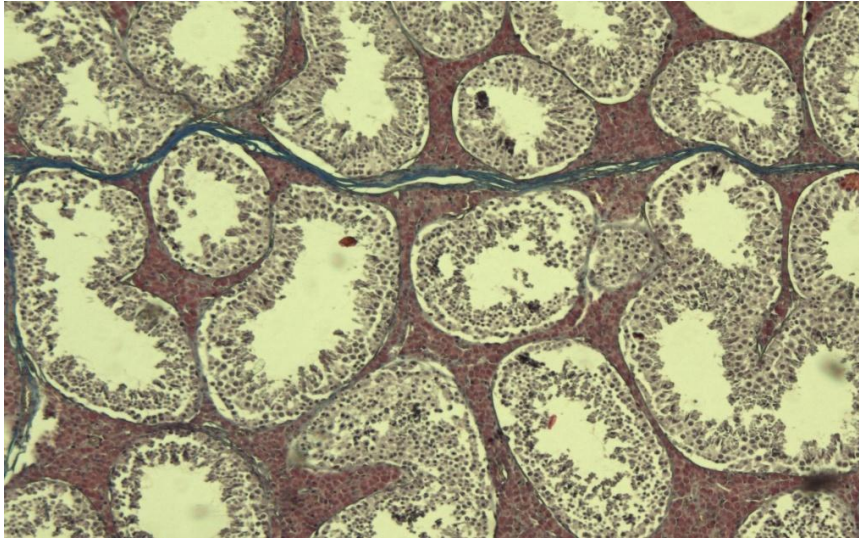
(E - eksperimentālā grupa / experimental group; K - kontroles grupa / control group)

Kuīļa id.nr. /Boar id.nr.	Grupa / Group	Sēklin.masa bez piedēkļa (g), / Weight of testis without epididymis (g),		Sēklinieka tilpums (ml), / Volume of testis (ml),		Sēklinieka piedēkļa masa (g), / Weight of epididymis (g),	
		labais / right	kreisais / left	labais / right	kreisais / left	labais / right	kreisais / left
4042	E	394.0	422.0	390.0	400.0	130.0	129.0
4043	E	435.0	424.0	440.0	420.0	114.0	114.0
5256	E	399.0	387.0	360.0	380.0	130.0	132.0
5253	E	436.0	451.0	400.0	400.0	131.0	131.0
4047	E	499.0	520.0	480.0	500.0	144.0	131.0
Vid.aritm. / Arithm. mean		432.6	440.8	414.0	420.0	129.8	127.4
Stand.nov. / Standard dev.		41.97	49.77	46.69	46.90	10.64	7.57
Stand.kļūda / Standard error		18.77	22.26	20.88	20.98	4.76	3.39
CI (95%)*		380.5...484.7	379.0...502.6	356.0...472.0	361.8...478.2	116.6...143.0	118.0...136.8
5254	K	334.0	384.0	310.0	320.0	107.0	119.0
5258	K	523.0	514.0	480.0	480.0	153.0	154.0
4048	K	331.0	353.0	300.0	320.0	132.0	133.0
4046	K	441.0	428.0	420.0	400.0	98.0	101.0
5255	K	405.0	431.0	380.0	400.0	125.0	129.0
Vid.aritm. / Arithm. mean		406.8	422.0	378.0	384.0	123.0	127.2
Stand.nov. / Standard dev.		80.19	60.80	75.63	66.93	21.60	19.42
Stand.kļūda / Standard error		35.86	27.19	33.82	29.93	9.66	8.69
CI (95%)*		307.2...506.4	346.5...497.5	284.1...471.9	300.9...467.1	96.2...149.8	103.1...151.3
p-vērtība / p-value		0.27	0.30	0.20	0.18	0.27	0.49
Nozīmīgums / Significance		-	-	-	-	-	-

\*Vidēja aritmētiskā 95% ticamības intervāls / 95% confidence interval of the arithmetic mean

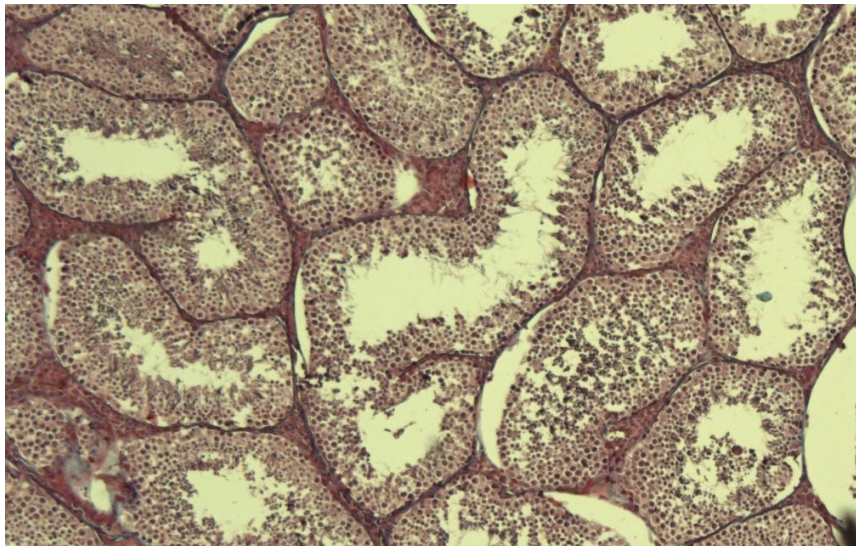
### **Histoloģiskie izmeklējumi**

Kā eksperimentālās tā kontroles grupu kailiņiem mikroskopā redzama normāla, sugai atbilstoša histoloģiskā uzbūve (2. att., 3. att.). Sēklinieku izlocītos kanāliņus izklāj perpendikulāri bazālajai membrānai novietotas balsta šūnas (Sertoli šūnas) un dažādās attīstības pakāpēs esošie spermatozoīdi. Spraugas starp līkumotajiem sēklinieka kanāliņiem aizņem labi attīstīti intersticiālie audi, kas ļoti bagāti ar intersticiālajiem glandulocītiem (Leidiga šūnām). Eksperimentālās grupas kailiņiem intersticiālo glandulocītu ir vairāk (2. att.) abu grupu dzīvniekiem intersticiālajos audos ir daudz nelielu asinsvadu, asins un limfas kapilāru.



2. attēls. Līkumotie sēklinieku kanāliņi un intersticiālie audi eksperimentālās grupas kailiņu sēkliniekos. Hematoksilīns-eozīns (x100)

Figure 2. Seminiferous tubules and intertubular tissues of boars' testis (experimental group). Hematoxylin-eosin (x100)



3. attēls. Līkumotie sēklinieku kanāliņi un intersticiālie audi eksperimentālās grupas kailiņiem. Hematoksilīns-eozīns (x100)

Figure 3. Seminiferous tubules and intertubular tissues of boars testis (control group). Hematoxylin-eosin (x100)

Lai noskaidrotu Mildronāta ietekmi uz spermatogēzes procesu, tika mērīts spermatogēnā epitēlija biezums abu grupu dzīvniekiem. Šo mērījumu rezultāti redzami 2. tabulā.

2. tabula/Table 2

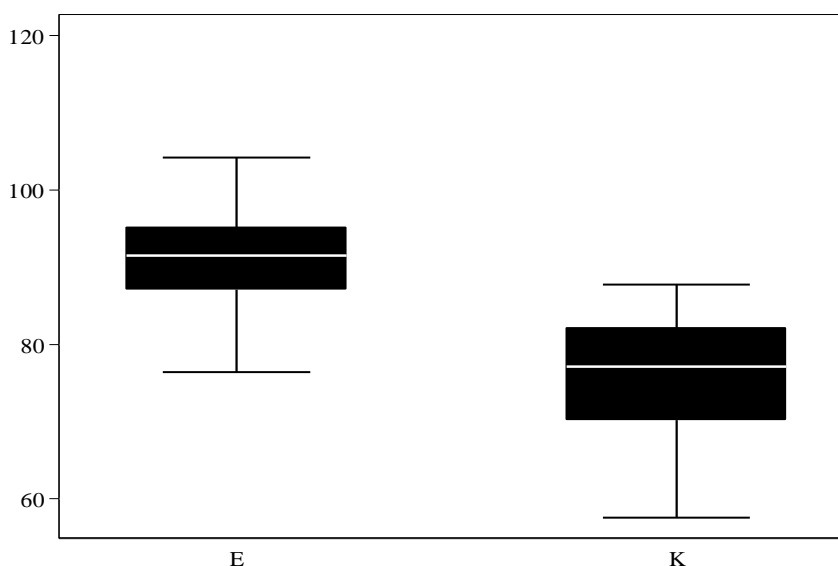
**Kuiļu spermatogēnā epitēlija biezums ( $\mu$ )**

**Thickness of spermatogeny epithelium ( $\mu$ )**

(E – eksperimentālā grupa / experimental group, K – kontroles grupa / control group)

Kuiļa id.nr. /Boar id.nr.	Grupa/ Group	Mērījumu vieta / Place of measurement					Vidējais / Mean
		1	2	3	4	5	
4673	E	103.73	95.13	93.43	88.22	83.32	92.77
4677	E	98.1	91.53	87.1	93.9	80.63	90.25
4683	E	88.23	76.41	82.15	79.9	96.0	84.54
4685	E	88.5	89.6	78.8	87.2	92.2	87.26
4691	E	93.3	104.2	96.7	94.6	98.3	97.42
Vid. aritmētiskais / Arithm. mean							90.45
Standartnovirze / Standard deviation							7.43
Standartklūda / Standard error							1.49
95% ticamības intervāls / 95% confidence interval							87.38.....93.51
5155	K	77.10	79.74	66.47	87.73	82.28	78.66
4046	K	81.75	84.34	82.13	81.68	86.21	83.22
40,48	K	78.73	74.79	74.77	82.46	72.01	76.55
5258	K	69.01	72.78	70.18	57.54	71.27	68.16
5758	K	70.07	68.63	83.31	80.46	68.91	74.28
Vid. aritmētiskais / Arithm. mean							76.16
Standartnovirze / Standard deviation							7.35
Standartklūda / Standard error							1.47
95% ticamības intervāls / 95% confidence interval							73.14.....79.21

Biezums / Thickness,  $\mu$ km



**4. attēls. Spermatogēnā epitēlija biezums**

Figure 4. **Thickness of spermatogeny epithelium**

E - eksperimentālā grupa / experimental group, K – kontroles grupa / control group

Mērījumu rezultātu analīze liecina, ka eksperimentālās grupas kuiļiem Mildronāta ietekmē spermatogēnā epitēlija biezums statistiski ticami ( $p < 0.01$ ) ir lielāks nekā



kontroles grupas dzīvniekiem. Spermatoģenēzes procesu visticamāk ietekmē gamma butirotbetaīna koncentrācijas palielināšanās audos, kas notiek mildronāta ietekmē (3), neskatoties uz faktu, ka notiek L-karnitīna biosintēzes inhibīcija (1).

## **KOPSAVILKUMS**

Mildronāta piedeva vaislas kuiļu barībā pozitīvi ietekmē sēklinieku morfoloģiju:

1. Novērojama neliela tendence palielināties to masai un tilpumam.
2. Samazinās atsevišķu kuiļu sēklinieku masas atšķirības.
3. Statistiski ticami palielinās spermatogēnā epitēlija biezums.
4. Sēklinieku stromā palielinās intersticiālo glandulocītu (Leidiga šūnu) skaits.

## **LITERARŪRA**

1. Dambrova, M., H. Cīrule, B. Svalbe, L. Zvejniece, O. Pugovichs, T. Zorenko, I. Kalviņš, E. Liepiņš, I. Belozerova. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // *Physiology & Behavior* XXX, 2008:7.
2. . Hyang ,Y., Johnson, R. K. Effect of selection for size of testis in boars on semen and testis traits // *J. Anim. Sci. (USA)*: 1996; 74 (4): 750-760.
3. Kalvinsh, I., Veveris, M. Birmans, A.. Pharmaceutial composition comprising gammabutirotbetaine for stimulating the sexual activity and potency; 2003;.WO/2003/022263 [WO/2003/022263]. Ref. Type: Patent.
4. Mustafins, P. Anaerobās slodzes sekas// *Ž. Doctus, jūnijs*, 2010; 34-38.
5. Rathje, T., Johnson, R. K. Effect of selecting for increased testis size in boars on testis development and rates of sperm production // *Nebraska*, 1994; *Swine Report*: 36 – 38.
6. Senger, P. L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 1<sup>st</sup> revised Ed. Washington State University Res. And Technology Part., Pullman: 1999; 281.
7. Крыжановский, С. А., Витинова, М. Б. Милдронат. В книге: *Современные лекарственные средства*. РИПОЛ Классик. 2007; 639.
8. Курашвили, Б. Е., Калвиньш, Я. И. Квинихадзе, С. Г. Кобахидзе, Л. Т. Минкеладзе, Л. Г. Чумбуридзе, С. Р. Результаты пищеварительных испытаний на цыплят стимулятора «кватерина» // *Известия академии наук СССР*, 1983; серия «Биология», 9: 4:142-149.
9. Романов, В. И. Процессы пищеварения и продуктивность телят при использовании кватерина в рационах // *Автореферат дисс. канд. вет. наук*, Дубровники: 1987; 1-23.

# MĀJAS SUŅU KUŅĢA ĢĻOTĀDAS VIRSMAS-BEDRĪŠU EPITĒLIJA MUKOĪDIE EPITELIOCĪTI UN HELIKOBAKTĒRIJU DAUDZUMS KUŅĢĪ

## MUCOID EPITHELIOCYTES IN THE SUPERFICIAL EPITHELIUM OF THE GASTRIC MUCOSA IN DOMESTIC DOGS AND AMOUNT OF HELICOBACTERIA IN THE STOMACH

**Dace Bērzina, Edīte Birģele**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Preklīniskais institūts, Latvija  
LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Preclinical institute, Latvia  
[dace.berzina@llu.lv](mailto:dace.berzina@llu.lv), [edite.birgele@llu.lv](mailto:edite.birgele@llu.lv)

### **ABSTRACT**

This study was carried out to evaluate number of mucoid epitheliocytes of superficial epithelium of the gastric mucosa in domestic dogs related to the amount of helicobacteria. Mucosal samples were taken from several places of cardiac, fundic and pyloric gland region of the stomach to detect helicobacteria and superficial mucoid epitheliocytes of the gastric mucosa with the light histological examination. The amount of helicobacteria was relatively differentiated into four groups: as absente, mild, moderate and severe quantity of helicobacteria. The amount of mucoid epitheliocytes was evaluated in average numbers with standard derivation. There are no marked differences in the number of the mucoid epitheliocytes related to amount of helicobacteria in the cardiac and fundic gland region. Whereas in the pyloric gland region there is remarkable proliferation of superficial mucoid epitheliocytes and increased mucoid secretion related with higher amount of helicobacteria.

**KEY WORDS:** helicobacteria, superficial mucoid epitheliocytes, dogs.

### **IEVADS**

Pirmo reizi helikobaktērijas dažādu sugu dzīvniekiem konstatēja 19. gs. beigās – J. Rappin 1881. gadā un G. Bizzozero 1893. gadā, bet 1896. gadā H. Salomon tās aprakstīja kā spirāliski izliektas baktērijas suņu, kaķu un Norvēģijas žurku kuņģos (Fox, Lee, 1997; Recordati et al., 2007). Tā kā helikobaktērijas ir grūti kultivēt barotnēs, sākotnēji tās nevarēja izolēt un identificēt (Owen, 1998). Tikai 1983. gadā pirmo reizi izolēja patogēno helikobaktēriju sugu *Helicobacter pylori* cilvēkiem, kas slimoja ar gastrītu (Marshall, Warren, 1983) un kuņģa čūlu (Marshall, Warren, 1984).

Daudzas helikobaktēriju sugas tiek uzskatītas par patogēnām. Savukārt citas helikobaktērijas tiek uzskatītas kā normāla gremošanas trakta mikroflora (Fox, Lee 1997; Simmons et al., 2000; Solnick, Schauter, 2001). Vairākos pētījumos pierādīts, ka suņiem un kaķiem kuņģa gļotādā patoloģiskās izmaiņas ir izteiktākas tieši dzīvniekiem, kuriem kuņģos atrod lielāku helikobaktēriju daudzumu (Hwang et al., 2002).

Atzīmēts, ka dzīvniekiem helikobaktērijas kuņģī konstatētas gļotādas mukoīdā sekrētā pie gļotādas virsmas epitēlija, kuņģa bedrītēs, dziedzeru lūmenā un pat klājšūnu kanāliņos (Yamasaki et al., 1998; Hwang et al., 2002). Kuņģa gļotādas virsmas epitēlija mukoīdo epiteliocītu producētais sekrēts satur neitrālos mukopolisaharīdus un bikarbonātus, kas aizsargā gļotādu no mehāniskiem kairinājumiem skābās kuņģa sulas

un fermentu iedarbības, tāpēc to skaita palielināšanās varētu liecināt par pastiprinātu kuņģa gļotādas aizsargreakciju (Owen, 2007).

Šī darba mērķis bija izpētīt kuņģa gļotādas virsmas-bedrīšu mukoīdo epitēlijšūnu skaita dinamiku saistībā ar helikobaktēriju daudzumu tajā.

#### **Darba uzdevumi:**

1. Noteikt helikobaktēriju daudzumu suņu kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas gļotādas virsmas-bedrīšu epitēlijā;
2. Novērtēt mukoīdo epiteliocītu skaitu kuņģa gļotādas virsmas-bedrīšu epitēlijā kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā saistībā ar helikobaktēriju daudzumu tajā.

### **MATERIĀLS UN METODIKA**

Materiālu ieguvām LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Mazo dzīvnieku klīnikā no 30 dažāda vecuma, dzimuma un šķirņu mājas suņiem. Kuņģa gļotādas paraugus paņēmām no četrām vietām kuņģa kardiālo dziedzeru zonā, astoņām vietām fundālo dziedzeru zonā un piecām vietām pilorisko dziedzeru zonā, tādējādi no katra dzīvnieka iegūstot 17 paraugus, kopumā izanalizējot 510 gļotādas paraugus.

Gļotādas paraugus fiksējām 10% buferētā neitrālā formalīna šķīdumā. Parafīna bloku sagatavošanai izmantoja audu auto-procesoru *Tissue-Tek II* (Nīderlande). Tālāk preparātus sagriezām mikrotomā *SLEE Mainz Cut* 4 μm biezās griezumās un krāsojām, izmantojot *Diff-Quick* metodi helikobaktēriju noteikšanai, kā arī hematoksilīna un eozīna metodi mukoīdo epiteliocītu skaita noteikšanai. Histoloģiskos preparātus izvērtējām gaismas mikroskopā *Leica DM5000B* eļļas imersijā 400 un 1000 reizi lielā palielinājumā.

Katra kuņģa gļotādas paraugā 10 mikroskopa redzes laukos noteicām helikobaktēriju lokalizāciju kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas virsmas epitēlijā un kuņģa bedrītēs (Vorobjova et al., 2005). Helikobaktēriju daudzumu dažādajās dziedzeru zonās nosacīti iedalījām četrās grupās (Neiger et al., 1998): helikobaktēriju vienā mikroskopa redzes laukā nav – negatīvs, 1-10 helikobaktērijas vienā redzes laukā – maz helikobaktēriju, 10-50 helikobaktērijas vienā redzes laukā – vidēji daudz helikobaktēriju un vairāk kā 50 helikobaktērijas vienā mikroskopa redzes laukā – ļoti daudz helikobaktēriju.

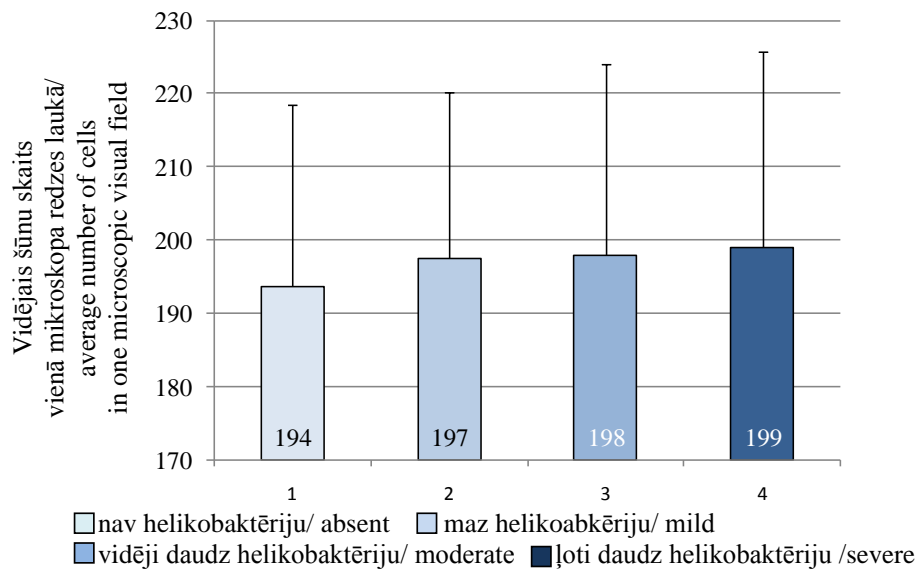
Kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas gļotādas virsmas-bedrīšu epitēlijā analizējām mukoīdo epitēlijšūnu daudzumu, nosakot vidējo šūnu skaitu ± standartnovirze vienā mikroskopa redzes laukā, kas sastādīja 215000 μm<sup>2</sup> jeb attiecīgi 0.215 mm<sup>2</sup>.

Mukoīdo epiteliocītu skaita atšķirības gļotādā analizējām ar Stjudenta t testu divu paraugkopu salīdzināšanai (Paura, Arhipova, 2002).

### **REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

Izmeklējot suņu kuņģa gļotādas paraugus izrādījās, ka 29 no 30 izmeklētajiem dzīvniekiem tika konstatētas helikobaktērijas. Kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas gļotādas mukoīdos epiteliocītus noteicām vietās, kurās helikobaktērijas nebija, vai bija mazā, vidēji lielā un ļoti lielā daudzumā.

Rezultātu izklāstu sāksim ar kuņģa kardiālo dziedzeru zonu, kuras 120 paraugos kopumā novērtējām 1200 mikroskopa redzes laukus. Vidējais mukoīdo epiteliocītu skaits gļotādas virsmas-bedrīšu epitēlijā vietās ar dažādu helikobaktēriju daudzumu atspoguļots 1. attēlā.

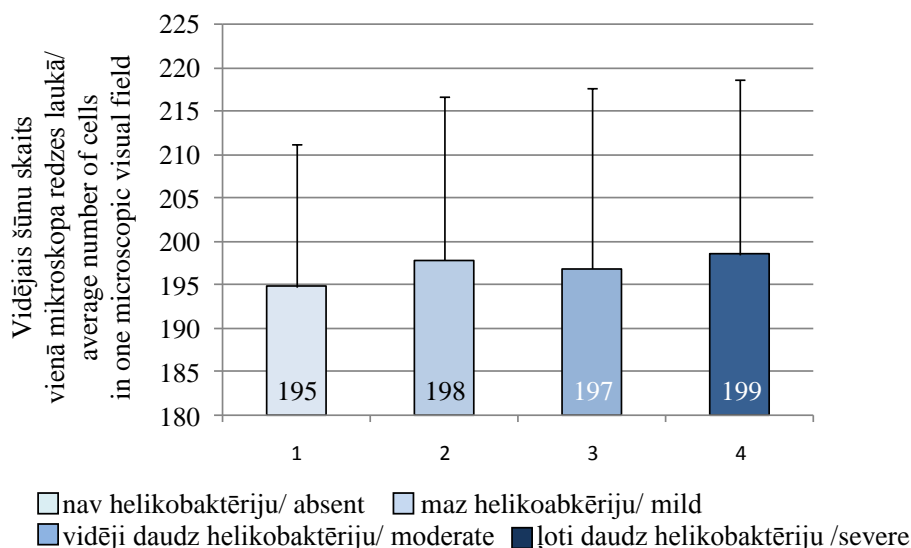


1. attēls. Mukoīdo epiteliocītu skaits suņu kuņģa kardiālo dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā

Figure. 1. Number of mucoid epitheliocytes in the superficial epithelium of the dogs stomach's cardiac gland region

Konstatējām, ka virsmas–bedrīšu epitēlijā vietās, kur helicobaktēriju nav, vienā mikroskopa redzes laukā vidēji bija  $194 \pm 25$  mukoīdo epiteliocītu, kas izrādījās nedaudz mazāk nekā vietās ar mazu, vidēji lielu un pat ļoti lielu helicobaktēriju daudzumu, kurās mukoīdie epiteliocīti vienā redzes laukā attiecīgi bija  $197 \pm 23$ ,  $198 \pm 26$  un  $199 \pm 27$ .

Fundālo dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlija mukoīdo epiteliocītu skaits atspoguļots 2. attēlā. Jāatzīmē, ka fundālo dziedzeru zonā kopumā 240 paraugos izmeklējām 2400 mikroskopa redzes laukus.



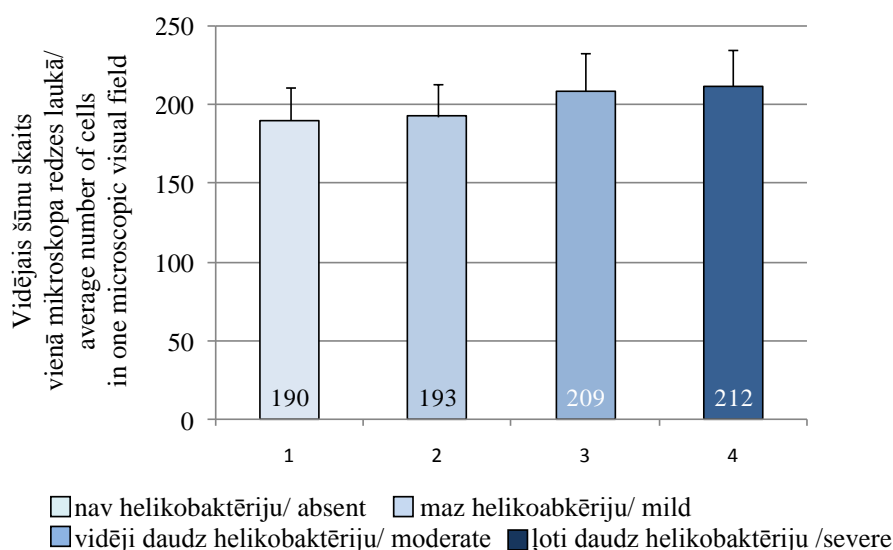
2. attēls. Mukoīdo epiteliocītu skaits suņu kuņģa fundālo dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā

Figure. 2. Number of mucoid epitheliocytes in the superficial epithelium of the dogs stomach's fundic gland region

Redzam, ka, līdzīgi kā tas bija kardiālo dziedzeru zonā, arī fundālo dziedzeru zonā virsmas–bedrīšu epitēlijā vietās, kur helikobaktēriju nebija, mukoīdo epiteliocītu skaits bija nedaudz mazāks nekā vietās ar dažāda daudzuma helikobaktērijām. Fundālo dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā vienā redzes laukā vidējais mukoīdo epiteliocītu skaits vietās bez helikobaktērijām vidēji bija  $195 \pm 16$ , bet vietās ar mazu, vidēji lielu un ļoti lielu helikobaktēriju daudzumu attiecīgi bija  $198 \pm 19$ ,  $197 \pm 21$  un  $199 \pm 20$  mukoīdie epiteliocīti vienā redzes laukā. Turklāt, arī virsmas–bedrīšu epitēlijšūnu izdalītais mukoīdais sekrēta daudzums gļotādā vietās ar dažādu helikobaktēriju skaitu praktiski neatšķīrās.

Tātad, suņu kardiālo un fundālo dziedzeru zonas gļotādā pat vidēji liels un ļoti liels helikobaktēriju daudzums virsmas–bedrīšu epitēlijā praktiski neietekmē mukoīdo epiteliocītu un tā producētā mukoīdā sekrēta daudzumu.

Savādāku ainu novērojām suņu pilorisko dziedzeru zonas gļotādā, kuras virsmas–bedrīšu epitēlija mukoīdo epiteliocītu skaits atspoguļots 3. attēlā. Jāatzīmē, ka pilorisko dziedzeru zonā kopumā 150 paraugos izmeklējām 1500 mikroskopa redzes laukus.



3. attēls. **Mukoīdo epiteliocītu skaits suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā**

Figure. 3. **Number of mucoid epitheliocytes in the superficial epithelium of the dogs stomach`s pyloric gland region**

Redzam, ka piloriskās dziedzeru zonas gļotādas vietās, kurās helikobaktērijas nekonstatēja, virsmas–bedrīšu epitēlijā mukoīdo epiteliocītu skaits vidēji ir  $190 \pm 21$  šūnas vienā redzes laukā, bet *Helicobacter spp.* pozitīvajos paraugos mukoīdo epiteliocītu skaits bija būtiski lielāks ( $p < 0.05$ ). Vietās ar mazu helikobaktēriju daudzumu mukoīdo epiteliocītu skaits vidēji bija  $193 \pm 20$  šūnas vienā redzes laukā, vietās ar vidēji lielu helikobaktēriju daudzumu tas bija  $209 \pm 24$  šūnas vienā redzes laukā, bet vietās ar ļoti lielu helikobaktēriju daudzumu tas jau bija  $212 \pm 23$  šūnas vienā redzes laukā ( $p < 0.05$ ). Tātad, līdz ar helikobaktēriju daudzuma pieaugumu suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādā, pakāpeniski pieauga arī virsmas–bedrīšu mukoīdo epiteliocītu daudzums.

Jāuzsver, ka šajos preparātos vienlaicīgi bija redzams arī liels mukoīdo epiteliocītu izdalītā mukoīdā sekrēta daudzums. Tātad varam secināt, ka pilorisko dziedzeru zonā vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijas izraisa kā virsmas–bedrīšu mukoīdo epiteliocītu proliferāciju, tā arī mukoīdā sekrēta pastiprinātu producēšanu. Kopumā tas

liecina par pilorisko dziedzeru zonas gļotādas aizsargreakciju (Vorobjova et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009).

### SECINĀJUMI

1. Suņu kuņģa kardiālo un fundālo dziedzeru zonā mukoīdo epiteliocītu skaits paraugos ar dažādu helikobaktēriju daudzumu būtiski neatšķiras.
2. Suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotāda reaģē uz vidēji un ļoti daudz helikobaktērijām ar virsmas–bedrīšu epitēlijā mukoīdo epiteliocītu skaita pieaugumu un pastiprinātu mukoīdā sekrēta producēšanu.

### LITERATŪRA

1. Fox, J.G., Lee, A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Laboratory Animal Science*. 1997; 47(3): 222-277.
2. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Decostere A., Ducatelle R. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology*. 2009; 22: 202-223.
3. Hwang, C.Y., Han, H.R., Youn, H.Y. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2002; 3(2): 123-156.
4. Marshall, B.J., Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; June 16, 1(8390): 1311-1315.
5. Marshall, B.J., Warren, J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; June 4, 1(8336): 1273 – 1275.
6. Neiger, R., Dieterich, C., Burnens, A., Waldvogel, A., Cortesy – Theulaz, I., Halter, F., Lauterburg, B., Schmassmann, A. Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36: 634-637.
7. Owen, D.A. Somach. In: Mills S.E., *Histology for pathologists*, 3rd. ed. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2007; 589-602.
8. Owen, R.J. *Helicobacter* – species classification and identification. *British Medical Bulletin*. 1998; 54 (no.1): 17-30.
9. Paura, L., Arhipova, I. Neparametriskās metodes. SPSS datorprogramma. LKC, Jelgava. 2002; 148.
10. Recordati, C., Gualdi, V., Tosi, S., Facchini, R.V., Pengo, G., Luini, M., Simpson, K.W. Detection of *Helicobacter spp.* DNA in the oral cavity of dogs. *Veterinary Microbiology*. 2007; 119: 346-351.
11. Simmons, J.h., Riley, L.K., Besch-Williford, C., Franklin, C.L. *Helicobacter mesocricetorum sp. nov.*, a novel helicobacter isolated from the feces of Syrian hamsters. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 1811-1817.
12. Solnick, J.V., Schauer, D.B. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology*. 2001; 14(1): 59-97.
13. Vorobjova, T., Hurlimann, S., Zimmermann, A., Uibo R., Halter F. *Helicobacter pylori* gastritis: glandular proliferation and homeostasis differ between gastric antrum and corpus. *Acta Medica Lithuanica*. 2005; 12(3): 18-27.
14. Yamasaki, K., Suematsu, H., Takahasi, T. Comparison of gastric lesions in dogs and cats with and without gastric spiral organisms. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1998; 212: 529-533.

# VAISLAS ĶĒVJU ASINS BIOĶĪMISKIE RĀDĪTĀJI DAŽĀDOS TURĒŠANAS APSTĀKĻOS

## BREEDING MARE BIOCHEMICAL PARAMETERS IN DIFFERENT HOUSING CONDITIONS

**Inta Caune, Aija Ilgaža**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Preklīniskais institūts

LUA, Faculty of Veterinarmedicine, Preclinical institute

[intacaune@inbox.lv](mailto:intacaune@inbox.lv)

### ABSTRACT

Blood biochemical analysis is the additional methods of investigation. Clinically healthy animals are usually no blood diagnostic tests, for economic reasons in Latvia. Equine veterinary practice in pregnant mares does not take blood tests, except when the mare enters the supervision of a veterinarian and a thorough investigation of the animal to maintain the pregnancy and the mare health. Food consumption is increasing in mares from the ninth month of pregnancy until calving period, since this happens during the most intense fetal growth and reaches approximately 10% of the weight of the mare. Work aimed at clarifying the winter / spring and summer seasonal housing conditions on the blood biochemical parameters of one herd of horses, non-pregnant and pregnant clinically healthy mares. Conclusions. Blood biochemical parameters are slightly altered in pregnant mares during pregnancy in the second half, as well as more visible changes in older mares. Changes in blood biochemical parameters are slightly altered from the housing and feeding conditions and the physiological status of horses.

**KEY WORDS:** horse, mares, blood biochemical analysis.

### IEVADS

Asins bioķīmiskās analīzes veterinārmedicīnas praksē pieskaita pie papildus izmeklēšanas metodēm. Latvijā klīniski veselīem dzīvniekiem ekonomisko apsvērumu dēļ asins izmeklējumus profilaktiskos un diagnostiskos nolūkos parasti neveic. Arī grūsnām ķēvēm asins analīzes netiek veiktas, izņemot gadījumus, kad, lai saglabātu grūsnību un ķēves veselību, ķēve nonāk veterinārārsta uzraudzībā un ir jāveic rūpīga dzīvnieka izmeklēšana.

Jaunākie pētījumi pierāda, ka pirmos grūsnības mēnešus auglis būtiski neietekmē vaislas ķēves organisma funkcijas un prasības. Sākot ar sesto grūsnības mēnesi ķēvēm palielinās vajadzība pēc barības piedevām, it sevišķi pēc mikro- un makroelementiem. Turklāt, ja ķēve tiek nodarbināta sportā, pētījuma autori iesaka samazināt fizisko slodzi. Kopējais barības patēriņš ķēvēm pieaug sākot no devītā grūsnības mēneša līdz pat atnešanās brīdim, jo šajā laikā notiek visintensīvākā augļa augšana un tas sasniedz apmēram 10% no ķēves svara (30- 60 kg) [1., 4., 5.] Bet trūkst ziņu, vai un kā grūsnība ietekmē asins bioķīmiskos rādītājus. Trūkst pētījumu, vai un kā šos rādītājus ietekmē katrai sezonai raksturīgie turēšanas un ēdināšanas apstākļi un vai vienādos apstākļos turētiem zirgiem šīs izmaiņas ir raksturīgas. Tāpēc mūsu **darba mērķis** bija noskaidrot ziemas un vasaras sezonai atbilstošu turēšanas apstākļu ietekmi uz asins bioķīmiskajiem rādītājiem viena ganāmpulka zirgiem- negrūsnām un grūsnām klīniski veselām ķēvēm.

### **Darba uzdevumi:**

1. Salīdzināt asins bioķīmisko analīžu rezultātus vienādos (ziemas/pavasara sezonai atbilstošos) apstākļos turētām negrūsnām vaislas ķēvēm un ķēvēm otrajā grūsnības pusē.
2. Noteikt iespējamās asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas zirgiem turētiem un ēdinātiem atšķirīgos, vasaras sezonai raksturīgos apstākļos.
3. Noskaidrot ziemas un vasaras sezonai atbilstošu turēšanas apstākļu ietekmi uz viena ganāmpulka zirgu asins bioķīmiskajiem rādītājiem.

### **MATERIĀLS UN METODIKA**

Pētījums tika veikts nelielā stallī Latvijā, kurā mīt pieauguši sporta tipa zirgi vecumā no sešiem līdz 17 gadiem. Ievācot anamnēzes datus un veicot vispārīgo klīnisko izmeklēšanu, pētījumā iekļāvām sešus zirgus. Visi zirgi pētījuma laikā bija klīniski veseli. Trīs ķēves bija grūsnas- aprīļa sākumā viena no ķēvēm bija astotajā un divas - devītajā grūsnības mēnesī. Šie dzīvnieki veidoja pirmo jeb grūсно dzīvnieku pētījumu grupu. Ganāmpulkā vēl bija trīs negrūsnas ķēves, kurām pēdējos 6 mēnešus nav bijusi grūsnība un laktācija. Šos trīs dzīvniekus nosacīti iedalījām otrajā jeb kontroles grupā.

Pirmo reizi asins paraugus visiem pētījumā iekļautajiem dzīvniekiem ņēmām aprīlī, tātad ziemas perioda beigās, kad vēl nav iestājusies ganību sezona. Zirgus šajā laikā baroja ar katram dzīvniekam atbilstošu daudzumu auzām, „Dobeles dzirnavnieka” kliju granulām un sienu (neierobežotā daudzumā), kā arī papildus tika doti vitamīni un mikroelementi. Grūsnās ķēves atbilstoši ieteikumiem kliju granulas saņēma 1.5 reizes vairāk nekā kontroles grupas dzīvnieki. Zirgiem visu laiku bija pieejams dzeramais ūdens un laizāmie sāls bloki. Tos regulāri diennakts gaišajā laikā laida aplokos, kā arī regulāri nodarbinājām nelielās fiziskās slodzēs.

Otro reizi asins paraugi tika ņemti jūlijā – tātad pēc trijiem mēnešiem. Ievācot anamnēzes datus, noskaidrojās, ka šajā laika periodā pētījuma grupas ķēves jau bija atnesušās. Ganību sezonas sākumā (maijā) visi zirgi bez ganību zāles vakaros stallī tika piebaroti ar sienu un kliju granulām, kā arī ar vitamīniem un mikroelementiem. Sākot ar jūniju abu grupu dzīvnieku tika turēti un baroti atšķirīgi. Kontroles grupas zirgi vairs nesaņēma spēkbarību un ganījās visu diennakti, bet pētījuma grupas ķēves ganījās tikai diennakts gaišajā laikā, bet vakarā stallī saņēma spēkbarību un sienu. Sāls un ūdens bija pieejams visiem zirgiem neierobežotā daudzumā.

Asins paraugi tika ņemti no rīta īsi pirms dzīvnieku barošanas un nogādāti uz laboratoriju Veterinārmedicīnas fakultātes Morfofunkcionālajā laboratorijā, kur veicām to pārbaudi. Asins bioķīmiskos rādītājus noteicām ar *BS - 120 Chemistry Analyzer, Mindray*. Katra zirga asins paraugā noteicām sekojošus bioķīmiskos rādītājus: kopējo proteīnu (KP), sārmaino fosfatāzi (AP), alanīnaminotransferāzi (ALAT), glikozi, urīnvielu (UREA), kreatinīnu (CREA), albumīnus, magniju (Mg) un fosforu (P).

Datu statistisko analīzi veicām, izmantojot Microsoft Excel, katram bioķīmiskajam rādītājam aprēķinot vidējo aritmētisko un standartnovirzi visiem kontroles un pētījumu grupas dzīvniekiem. Lai noskaidrotu cik būtiskas ir konstatētās atšķirības, datus pārbaudījām ar t-testu vidējo rādītāju salīdzināšanai.

### **REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

Pirmais mūsu darba uzdevums bija noskaidrot, vai atšķiras asins bioķīmiskie rādītāji vienādos ziemas sezonai atbilstošos apstākļos turētām negrūsnām vaislas ķēvēm un ķēvēm otrajā grūsnības pusē. Tā kā pētījumā iekļauto dzīvnieku skaits ir neliels, analīzi uzsāksim apskatot no katra dzīvnieka iegūtos asins bioķīmisko rādītāju rezultātus. Iegūtie rezultāti apkopoti 1. tabulā.



**Grūsnu un negrūsnu ķēvju asins bioķīmisko analīžu rezultāti**  
**Blood biochemical analysis results in pregnant and non-pregnant mares groups**

Zirgs/horse, vecums gados/ years old	KP/TP (g/l)	AP / ALKP (IU/l)	ALAT / ALT (IU/l)	Glikoze/Glycose (mmol/l)	UREA / BUN (mmol/l)	CREA / CREA (μmol/l)	Albumīni/Albumin (g/dl)	Mg / Mg (mmol/l)	P / P (mmol/l)
grūsna ķēve/ pregnant mare, 17	<b>65</b>	<b>292.1</b>	<b>20.7</b>	4.2	4.2	140.18	35.25	0.9	0.7
grūsna ķēve/ pregnant mare, 6	<b>64</b>	<b>442.8</b>	<b>23.2</b>	<b>6.1</b>	3.1	114.02	32.47	<b>1.6</b>	0.8
grūsna ķēve/ pregnant mare, 13	<b>65</b>	<b>329.7</b>	<b>23.6</b>	<b>5.7</b>	4.4	118.14	36.62	0.9	1.1
negrūsna ķēve/ nonpregnant mare, 11	<b>60</b>	<b>292.4</b>	<b>21.8</b>	4.6	4.2	146.08	25.13	1.0	0.9
negrūsna ķēve/ nonpregnant mare, 12	<b>62</b>	<b>263.9</b>	<b>22.1</b>	4.8	5.3	111.59	36.57	0.9	1.0
negrūsna ķēve/ nonpregnant mare, 10	72	202.4	<b>23.1</b>	4.9	3.9	131.03	<b>39.33</b>	1.0	1.0
<i>Normas robežas [3.]</i>	66 - 77	95 - 233	4 - 18	3.5 - 5.6	3.7 - 8.8	77 - 175	25 - 38	0.7 - 1.1	0.7 - 1.7

Aprīlī ņemto asins paraugu bioķīmiskās analīzes parādīja, ka visām ķēvēm ziemas perioda beigās, izņemot vienu, asinīs ir samazināts kopējā proteīna (KP) daudzums. Tas norāda, ka, kaut arī dzīvnieki tika baroti atbilstoši spēkbarības ražotāju ieteikumiem, izēdinātajā barībā trūkst proteīna - it sevišķi grūsno dzīvnieku grupas dzīvniekiem. Savukārt glikozes līmenis grūsnajām ķēvēm bija normas robežās vai nedaudz virs normas, kas, savukārt, norāda, ka dzīvnieki necieš no enerģijas trūkuma.

Sārmainās fosfatāze (AP) grūsnajām ķēvēm bija 1.5- 2 reizes augstāka par augšējo pieļaujamo normas robežu. Arī ALAT rezultāti bija nedaudz palielināti visiem zirgiem (skat. 1. tab.). Sārmainās fosfatāzes paaugstināšanās varētu būt saistīta ar ķēvju 8-9 grūsnības mēnesi, kad notiek ļoti intensīva augļa augšana, jo literatūrā ir atzīmēts, ka

sārmainā fosfatāze atrodas placentā un ka tās līmenis var būt paaugstināts intensīvi augošiem dzīvniekiem. Pēc literatūras datiem par iespējamu klīnisku saslimšanu liecina sārmainās fosfatāzes palielināšanās 2.5- 3 reizes [2., 3.]. Mūsu pētījumā tik liela AP paaugstināšanās netika konstatēta nevienam dzīvniekam.

Lai noskaidrotu, vai konstatētās atšķirības starp pētījuma grupā iekļautajām grūsnajām ķēvēm un kontroles grupas negrūsnajiem dzīvniekiem ir būtiskas, bioķīmisko rādītājus vidējās vērtības salīdzinājām, izmantojot t-testu divu paraugkopu vidējo aritmētisko salīdzināšanai. Iegūtie rezultāti apkopoti 2. tabulā.

2.tabula/Table 2

**Asins bioķīmisko rādītāju atšķirības grūсно un negrūсно ķēvju grupu dzīvniekiem**  
**Differences in blood biochemical parameters in pregnant and non-pregnant mares**  
**groups**

Pētījuma grupas/ Research groups	Asins bioķīmiskie rādītāji (vidējais aritmētiskais ± standartnovirze)/ Blood biochemical parameters (arithmetic mean ± standard deviation)								
	KP/TP (g/l)	AP /ALKP (IU/l)	ALAT/ALT (IU/l)	Glikoze/Glycose (mmol/l)	UREA / BUN (mmol/l)	CREA / CREA (μmol/l)	Albumīni/Albumin (g/dl)	Mg / Mg (mmol/l)	P / P (mmol/l)
Grūsnas ķēves/ pregnant mare	64.7± 0.6	354.9± 78.5	22.5± 1.6	5.3± 1.0	3.9± 0.7	124.1± 14.1	34.8± 2.1	1.1± 0.4	0.9± 0.21
Negrūsnas ķēves/ nonpregnant mare	61.3± 0.9	266.2± 10.8	22.3± 0.5	4.8± 0.1	4.5± 0.6	129.6± 11.9	33.7± 5.7	0.96± 0.04	0.96± 0.04
T-testa rezultāti / t-test (p)	0.006	0.045	0.4	0.2	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2

Mūsu aprēķini parādīja, ka negrūсно ķēvju grupas dzīvniekiem kopēja proteīna daudzums asinīs bija būtiski zemāks nekā grūсно dzīvnieku grupas zirgiem (P=99%). Vēlreiz gribam uzsvērt, ka abu grupu dzīvniekiem kopēja proteīna līmenis asinīs bija zem apakšējās pieļaujamās normas robežas - vidējie rādītāji attiecīgi 64.7 ± 0.6 g/l grūsnajām un 61.3 ± 0.9 g/l negrūsnajām ķēvēm. To varētu izskaidrot ar to, ka grūsnās ķēves tomēr saņēma 1,5 reizes lielāku spēkbarības daudzumu, kas acīmredzot tomēr bija nepietiekama. Arī citi autori iesaka - grūsnām ķēvēm pēdējos grūsnības mēnešos ir būtiski jāpalielina izēdināmās barības daudzumus [4., 5., 6.].

Attiecībā uz sārmainās fosfatāzes (AP) līmeni jāsaprot, ka gan grūсно ķēvju, gan negrūсно ķēvju grupas dzīvnieku asinīs tā vidējie rādītāji nedaudz pārsniedz pieļaujamās normas robežas. Pēc literatūrā atrodamajām ziņām vairākkārtīgu (2.5-3 reizes) sārmainās fosfatāzes palielināšanos var izskaidrot ar holestāzi un aknu problēmām vēl pirms klīnisko pazīmju sākšanās [2.]. Mūsu gadījumā šī nelielā paaugstināšanās var norādīt vienīgi uz palielinātu slodzi aknām. Turklāt grūsnajām ķēvēm AP līmenis bija būtiski augstāks - vidējie rādītāji attiecīgi 354.9 ± 78.5 un 266.2

$\pm 10.8$  IU/l ( $P=95\%$ ). Pārējās asins bioķīmisko rādītāju vidējās vērtības abu grupu ķēvēm būtiski neatšķirās, turklāt atradās fizioloģiski pieļaujamo normu robežās. Grūsnības laikā ķēvju organismā paaugstinās vielmaiņas procesi, taču homeostāzes mehānisms cenšas saglabāt līdzsvaru organismā un līdz ar to asins bioķīmiskajās analīzēs novēro konstantu līmeni. Dažu parametru izmaiņas gan var konstatēt veicot regulāras asins analīzes, piemēram, reizi mēnesī. [7.]

Otrs šī pētījuma uzdevums bija noskaidrot iespējamās asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas zirgiem turētiem un ēdinātiem atšķirīgos, vasaras sezonai raksturīgos apstākļos. Kā jau minējām, asins analīzes tika ņemtas jūlija beigās, kad abu pētījuma grupu zirgi jau divus mēnešus tika turēti un baroti atšķirīgi - kontroles grupas zirgi tikai ganībās (ganību grupa), bet pētījuma grupas ķēves ganībās un stallī, kur vakaros saņēma spēkbarību un sienu (ganību/staļļa grupa). Iegūtie rezultāti apkopoti 3. tabulā.

3. tabula/Table 3

**Ganību un ganību/ staļļa grupas zirgu asins bioķīmiskie rādītāji**  
**Grazing and grazing/stable groups of horse blood biochemical parameters**

Pētījuma grupas/ Research groups	Asins bioķīmiskie rādītāji (vidējais aritmētiskais $\pm$ standartnovirze)/ Blood biochemical parameters (arithmetic mean $\pm$ standard deviation)								
	KP/TP (g/l)	AP /ALKP (IU/l)	ALAT/ALT (IU/l)	Glikoze/Glycose (mmol/l)	UREA / BUN (mmol/l)	CREA / CREA ( $\mu$ mol/l)	Albumīni/Albumin (g/dl)	Mg / Mg (mmol/l)	P / P (mmol/l)
Ganību grupa/ Grazing gr.	71,7 $\pm$ 5,03	213,2 $\pm$ 28,8	18,3 $\pm$ 0,8	4,7 $\pm$ 0,6	6 $\pm$ 0,6	119,0 $\pm$ 6,31	34,7 $\pm$ 0,66	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1
Ganību/staļļa gr./ Grazing/stable gr.	71 $\pm$ 3,0	187 $\pm$ 15,2	15 $\pm$ 0,9	4,96 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 0,2	120 $\pm$ 3,5	36,95 $\pm$ 0,475	0,93 $\pm$ 0,15	0,9 $\pm$ 0,29
T-testa rezultāti/ t-test (p)	0,85	0,693	0,061	0,747	0,350	0,804	0,009	0,725	0,86

Abu pētījuma grupu ķēvju asins bioķīmiskajās analīzēs redzam, ka kopējā proteīna līmenis vasaras periodā ir paaugstinājies un gandrīz sasniedz normas augstākās robežas. Tas skaidrojams ar neierobežotu ganību zāles pieejamību visiem pētījumā iekļautajiem zirgiem. Arī literatūrā pieejamos datus ir atzīmēts, ka zirgiem vislabāk ir atrasties ganībās un ēst ganību zāli [4.] Albumīnu vidējo rādītāju līmenis visiem pētāmajiem dzīvniekiem bija normas robežās - attiecīgi  $34.7 \pm 0.66$  g/dl ganību grupas zirgiem un  $36.95 \pm 0.475$  g/dl ganību/ staļļa grupas zirgiem. Tomēr izrādījās, ka ganību grupas zirgiem albumīnu daudzums asins serumā bija būtiski zemāks nekā ganību/ staļļa grupas zirgiem ( $P=99\%$ ). To var izskaidrot ar papildus spēkbarības devu, ko zirgi saņēma, vakaros atgriežoties staļļos (skat. 3. att.).

Lai to noskaidrotu ziemas un vasaras sezonai atbilstošu turēšanas apstākļu ietekmi uz viena ganāmpulka zirgu asins bioķīmiskajiem rādītājiem, asins bioķīmiskos rādītājus

noteicām kontroles grupas negrūsnajiem dzīvniekiem, barotiem un turētiem ziemas periodam raksturīgos apstākļos (kontroles grupa, asins paraugi, ņemti aprīlī) un šiem pašiem dzīvniekiem ganību sezonas laikā (ganību grupa, jūlijs). Iegūtie rezultāti apkopoti 4. tabulā.

4. tabula/Table 4

**Ziemas un vasaras perioda zirgu asins bioķīmisko analīžu salīdzinājums**  
**Horse blood biochemical parameters comparison of summer and winter period**

Pētījuma grupas/ Research groups	Asins bioķīmiskie rādītāji (vidējais aritmētiskais ± standartnovirze)/ Blood biochemical parameters (arithmetic mean ± standard deviation)								
	KP/TP (g/l)	AP /ALKP (IU/l)	ALAT/ALT (IU/l)	Glikoze/Glycos e	UREA / BUN (mmol/l)	CREA / CREA (μmol/l)	Albumīni/Albu min	Mg / Mg (mmol/l)	P / P (mmol/l)
Ziemas gr./ Winter gr.	61.3± 0.9	266,2± 10,8	22,3± 0,5	4.8± 0.1	4.5± 0.6	129.6± 11.9	33.7± 5.7	0.96± 0.04	0.96± 0.04
Vasaras gr./ Summer gr.	71± 3,0	213,2± 28,8	18,3± 0,8	4,96± 1,0	5,6± 0,2	120± 3,5	36,95± 0,475	0,93± 0,15	0,9± 0,29
T-testa rezultāti/ t-test (p)	0,007	0.054	0,08	0,75	0,06	0,41	0,49	0,74	0,59

Pēc datu apstrādes redzam, ka ziemas periodā negrūсно zirgu grupas dzīvniekiem kopējo olbaltumvielu līmenis asinīs bija būtiski zemāks nekā šiem pašiem dzīvniekiem vasaras periodā (P=99%). Vasaras periodā šiem dzīvniekiem kopējā proteīna līmenis bija tuvu augšējai normas robežai -  $71.7 \pm 5.03$  g/l, bet ziemas periodā tas bija pazemināts -  $61.3 \pm 0.9$  g/l. Kopējā proteīna līmeņa paaugstināšanos vasaras periodā var izskaidrot ar pilnvērtīgāku barību neierobežotā daudzumā - ganību zāli. Literatūrā atrodami ieteikumi, ka zirgiem vasaras periodā vislabāk ir ganīties, taču mums neizdevās atrast asins bioķīmisko rādītāju vērtējumu ziemas un vasaras apstākļos turētiem zirgiem [4.]

Latvijā veterinārmedicīnā, atšķirībā no humānās medicīnas, asinis bioķīmiski un arī hematoloģiski netiek izmeklētas profilakses nolūkos, kas dotu iespēju laicīgi labot iespējamās ēdināšanas un turēšanas kļūdas, kā arī novērstu veselības traucējumus. Grūsnēm dzīvniekiem (arī ķēvēm) bioķīmiskie izmeklējumi tiek veikti tikai tad, kad dzīvniekiem jau ir sākušies klīniski konstatējumi veselības traucējumi, kas nereti apdraud veiksmīgu grūsnības iznākumu. Šis ir tikai ieskata pētījums, kas parādīja, ka turpmākie pētījumi šajā virzienā noteikti jāturpina.

## SECINĀJUMI

1. Pazemināts kopējā olbaltumvielu daudzums asinīs norāda, ka ziemas perioda noslēgumā īpaša vērtība jāpievērš proteīna daudzumam izēdināmā barībā, it sevišķi grūsnām ķēvēm.
2. Grūsnības otrajā semestrī ķēvju asinīs būtiski paaugstinās sārmainās fosfatāzes līmenis, pārsniedzot normas robežas.
3. Papildus spēkbarības un siena deva diennakts tumšajā laikā, turot zirgus stallī, bet dienā ganībās, asinīs būtiski paaugstina albumīna, kā arī kopējo olbaltumvielu līmeni.

## LITERATŪRA

1. Afanasjevs, I., Veterinārā dzemdniecība un ginekoloģija.- Zvaigzne. 1983; 352-353.
2. Jemeljanovs, L., Mancevičs, Z., Dūrītis, I. Dzīvnieku iekšējīgo slimību klīniskā diagnostika.- Jelgava. 2007. 118-216.
3. Jemeljanovs, L., Dūrītis, I., Beinerts, J. Dzīvnieku iekšējīgo slimību laboratoriskā diagnostika.- Jelgava. 2008; 1-78.
4. [http://www.levertonco.co.uk/acatalog/Feeding\\_Pregnant\\_Mares.html](http://www.levertonco.co.uk/acatalog/Feeding_Pregnant_Mares.html)
5. <http://www.animavet.com/FeedingPregMares.pdf>
6. [http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1231&context=extension\\_hist](http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1231&context=extension_hist)
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134073>
8. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=22731396>

# INOVATĪVA SASTĀVA BROILERCĀĻU GAĻAS IEGUVE

## OBTAINING OF INNOVATIVE COMPOSITION BROILER CHICKEN MEAT PRODUCTION

**Sallija Cerīna, Aleksandrs Jemeljanovs, Vera Krastiņa, Īra Irēna Vītiņa**  
LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvija  
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra” Latvia  
[sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

### ABSTRACT

Innovative composition of broiler chicken meat, in comparison with commercial mass production, contains higher levels of omega-6 and omega-3 fatty acids and carotenoids complex which positively influence human health and prevent risk factors causing different diseases. The research aim was to evaluate the possibility to obtain broiler chicken meat of innovative composition, and to evaluate the expenses of production in bioeconomic aspects by using feed that contains an increased amount of omega-6 and omega-3 fatty acids and additives of carotenoids. Feeding trial was carried with cross ROSS 308 broiler chicken in the age from 1 to 42 days (n=300). It was concluded that the best combination in broiler chicken feed for producing innovative composition meat was 1% flax seed oil, 1% rapeseed oil, and 2% soya bean oil and 0.1% additives of carotenoids complex. Using the mentioned oil and antioxidant composition the obtained broiler chicken meat contained the amount of omega-6 fatty acids of 27.4%, omega-3 fatty acids- 8.3% and carotenoids - 0.86 mg kg<sup>-1</sup>, it is by 3.9%, 3.2% and 0.24 mg kg<sup>-1</sup> and live weight by 7.87% higher in comparison with commercial mass productions and productivity.

In trial the expenses of feed consumption per 1000 broiler chicken breeding were by 1.7% higher than commercial feed, while broiler chicken productivity was 7.9% higher, since the total income from sales of 1000 broiler chicken breeding amounted to LVL 293.47 or it was 15% higher than selling commercial mass production. Innovative composition of broiler chicken meat production do not change environment.

**KEY WORDS:** broiler chicken, vegetable oil, fatty acids, environment, expenses.

### IEVADS

Putnu gaļas ražošanas mērķis ir palielināt kvalitatīvu inovatīvu putnkopības produktu ražošanu. Inovatīvie pārtikas produkti satur tādas bioloģiski aktīvas vielas, kas labvēlīgi ietekmē cilvēka organisma funkcijas, samazina dažādu slimību riska faktorus un veicina veselības saglabāšanu. (Zariņš, Neimane, 2002). Kvalitatīva un veselībai labvēlīga putnu gaļa raksturojas ar augstu polinepiesātināto taukskābju (omega-6 un omega-3), vitamīnu, antioksidantu (karotinoīdu) un minerālvielu saturu, bet zemu piesātināto taukskābju un holesterīna līmeni (Holub, 2002; Bodnieks, 2008). Jāatzīmē, ka nepareiza uztura dēļ pasaulē un Latvijā iedzīvotāji visvairāk slimo ar sirds un asinsvadu slimībām (WHO, 2003). Viens no šo slimību augsta riska faktoriem ir omegas grupas taukskābju (linolēnskābes un linolskābes) un antioksidantu (karotinoīdu) deficīts ikdienas pārtikas produktos. Uzņemot ar uzturproduktiem omega grupas taukskābes un antioksidantus, tiek labāk sekmēta holesterīna vielu maiņa cilvēka organismā un novērsti riska faktori, kas izraisa sirds un asinsvadu, audzēju, reimatismu u.c. slimības (Aro, 2000). Taukskābes cilvēku organismā tiek pakļautas lielākā vai

mazākā mērā oksidācijas procesiem. Taukskābju oksidācijas procesā rodas brīvie ķīmiskie radikāļi, kurus neitralizē antioksidanti: karotinoīdi, selēns, E vitamīns u.c. Tādēļ, ražojot taukskābēm bagātus produktus, tajos jāpalielina arī antioksidantu – īpaši karotinoīdu saturs (Surai, 2002). Latvijā ir visas iespējas attīstīt inovatīva sastāva broilercāļu ražošanu ar paaugstinātu omega grupas taukskābju un antioksidantu saturu, jo Latvijā tiek ražoti barības līdzekļi ar paaugstinātu omega-6 un omega-3 saturu. Inovatīvu broilercāļu ražošanas pamatā ir putnu ēdināšanā ar polinepiesātinātām taukskābēm bagātinātus barības līdzekļu izmantojot sojas, rapša un linsēklas eļļas kombinācijas.

Viena no putnkopības produktu ražošanas problēmām ir vides piesārņojums. Broilercāļu mēsli un to sastāvā esošie slāpekļvielu un fosforu saturošie komponenti kā arī gremošanas mikroflora ir galvenie dabas piesārņotāji (Coelho, 1999; Nahm, Wathes, 1998) Dažādu vēl pilnībā neizpētītu faktoru (barības komponenti, antinutritīvie barības savienojumi, aminoskābju nesabalansētība, stress u.c.) ietekmē broilercāļu zarnās samazinās barības vielu sagremojamība un no putnu organisma apkārtējā vidē pastiprināti izdalās nesagremotās barības vielas, proteīna, slāpekļvielu substances un nevēlamā gremošanas mikroflora (Baidoo, 2000, Blair et al., 1999.) Nesagremotai kopproteīna masai bakterioloģiski sadaloties rodas nepatīkama smaka no slāpekļa savienojumiem (amonjaks, nitrīti, u.c.), ogļskābās gāzes un sērūdeņraža. Tādējādi broilercāļu mītnes, mēsli un gaiss piesārņo apkārtējo vidi ar cilvēku un dzīvnieku organismam nevēlamu un kaitīgu ķīmisko un bakterioloģisko piesārņojumu.

Pētījuma mērķis - izvērtēt inovatīva sastāva broilercāļu ražošanas galvenos aspektus: iegūtās produkcijas kvalitāti, izmaksas un ietekmi uz apkārtējo vidi.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Broilercāļu ēdināšanas izmēģinājumu veica LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta „Sigrā” vivārijā ar krosa Ross-308 broilercāļiem no 1 - 42 dienu vecumam. Pēc analoga principa broilercāļus sadalīja 2 grupās (n=200). Izmēģinājumu veica pēc 1. tabulā norādītās shēmas.

1. tabula/Table 1

### Ēdināšanas izmēģinājuma shēma ar broilercāļiem Broiler chickens trial scheme

Grupa Group	Ēdināšanas programma Feeding programme
1. Grupa – kontrole 1 <sup>st</sup> group – control	PB – pamatbarība + 4% sojas eļļa Basic feed content 4% soyabean oil
2. Izmēģinājuma grupa 2nd trial group	PB – pamatbarība + 2% sojas eļļa + 1% rapšu eļļa + 1% linsēklu eļļa + 0.1% karotinoīdu saturošais komplekss Basic feed content 2% soyabean oil and 1% rapeseed oil and 1% linseed oil and 0.1% complex carotenoids

Pamatbarības sastāvs visu grupu broilercāļiem sabalansēts atbilstoši krosa ROSS 308 normatīvu norādēm (Ross Broiler Management, 2002). Kontroles grupas (1. grupa) broilercāļiem izēdināja pamatbarību ar 4% sojas eļļas saturu. Izmēģinājuma (2. grupa) broilercāļu barībai pievienoja 2% sojas, 1% rapša un 1% linsēklu eļļas un 0.1% karotinoīdu, antioksidantus saturošu kompleksu ar nolūku paaugstināt omega-3, omega-6 taukskābju un antioksidantu karotinoīdu saturu barības devās (1.tab.).

Izmēģinājuma periodā broilercāļu produktivitāti novērtēja, uzskaitot:

- broilera dzīvmasu, sverot katru putnu individuāli 7, 14, 21, 28, 35 un 42 dienu vecumā;
- barības patēriņu – sverot barību katru dienu pa grupām;
- saglabāšanos – uzskaitīja katru dienu kritušos putnus.

Aprēķināja: broilercāļu dzīvmasu un dzīvmasas pieaugumu, barības patēriņu 1 kg dzīvmasas ieguvei, barības patēriņa izmaksas. 42 dienu vecumā broilera gaļā analizēja omega-3 un omega-6 taukskābju daudzumu (realizācijas vecums), barības un mēslu ķīmisko sastāvu, slāpekļa sagremojamības koeficientu. Analīzes veica LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta "Sagra" akreditētā bioķīmijas un mikrobioloģijas zinātniskā laboratorijā.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Broilera produktivitātes pamatrādītāji ir dzīvmasa, dzīvmasas pieaugums, barības patēriņš un izmaksas.

2. tabula/Table 2

### Broilercāļu produktivitāte Productivity of broiler chicken

Rādītāji Parameters	1. Grupa – kontrolē 1 <sup>st</sup> group-control	2. Izmēģinājuma grupa 2 <sup>nd</sup> group-trial	± pret kontroli ± to control
Broilercāļu dzīvmasa 42 dienu vecumā, g Broiler chicken live weight at the age 42 days, g	2822 ±302	3044±	+222
% pret kontroli/% to control	100	107.86	+7.86
Dzīvmasas pieaugums diennaktī, g Live weight gain per day, g	66.21	71.49	+5.28
% pret kontroli/% to control	100	107.97	+7.97
Saglabāšanās, %/ Survival, %	98	99	+1.0

Izmēģinājuma periodā broilera produktivitāte ir augsta. Vidējais dzīvmasas lielums broilera realizācijas vecumā bija robežās no 2822-3044 g un dzīvmasas pieaugums diennaktī 66.21-71.49 g (2.tab.).

Izēdinot broilera barību, kas bagātināta ar omega-6, omega-3 taukskābēm un karotinoīdiem, broilera dzīvmasa un dzīvmasas diennakts pieaugums ir attiecīgi par 7.87% un 7.98% lielāks salīdzinot ar 1. grupu (kontroles variants).



**Broileru barības patēriņš un tā izmaksas izmēģinājuma periodā**  
**Feed consumption and feed costs for trial broilers**

Rādītāji Parameters	1.Grupa – kontrole 1 <sup>st</sup> group-control	2.Izmēģinājuma grupa 2 <sup>nd</sup> group-trial
Barības patēriņš vienam broilerim izaudzēšanas periodā, kg Feed consumption per one broiler during the breeding period, kg	5.40	5.20
Barības patēriņš 1 kg dzīvmasas ieguvei, kg Feed consumption for production of 1 kg live weight, kg	1.91	1.71
% pret kontroli/% to control	100	89.5
1 kg barības cena, LVL Feed price of 1 kg, LVL	0.207	0.220
Kopējās barības izmaksas 1 putna izaudzēšanai, LVL Total feed costs for breeding one bird, LVL	1.12	1.14
% pret kontroli/% to control	100	101.78
Barības izmaksas 1 kg dzīvmasas pieauguma ieguvei, LVL Feed costs for production of 1 kg live weight gain, LVL	0.40	0.38
% pret kontroli/% to control	100	95.0

Vidēji katrs broilercālis izaudzēšanas periodā patērēja šādu barības daudzumu: 1.grupā 5.40 kg, 2. grupā 5.20 kg. Barības patēriņš viena broilera izaudzēšanai 2. grupā bija par 0.20 kg mazāks nekā 1. grupai. Rezultātā arī barības patēriņš 1 kg dzīvmasas ieguvei par 10.47% mazāks nekā 1. grupai. Barības izmaksas viena kilograma dzīvmasas pieauguma (0.38 LVL/kg) ieguvei bija mazāks nekā 1. grupai (3.tab.).

**Inovātīvas broilercāļu gaļas kvalitātes rādītāji**  
**Quality indices of innovative composition of broiler chicken meat**

Rādītāji Parameters	1.Grupa – kontrolē 1 <sup>st</sup> group-control	2.Izmēģinājuma grupa 2 <sup>nd</sup> group-trial	± pret kontroli ± to control
∑ omega-6 (ω-6) taukskābe, % no kopējo lipīdu daudzuma ∑ omega-6 (ω-6) fatty acids, % of total lipids	23.5	27.4	+3.9
∑ omega-3 (ω-3) taukskābe, % no kopējo lipīdu daudzuma ∑ omega-3 (ω-3) fatty acids, % of total lipids	5.4	8.3	+2.9
∑ (ω-6) : ∑(ω-3)	4.3 : 1	3.3 : 1	-1.0 : 1
∑ kopējie karotinoīdi, mg kg <sup>-1</sup> (antioksidanti) ∑ total carotenoids, mg kg <sup>-1</sup> (antioxidant)	0.62	0.86	+0.24

Ēdinot broilerus ar tradicionāla sastāva barību (1. grupa) broilera gaļa satur 23.5% omega-6 un 5.4% omega-3 taukskābes, rēķinot % no kopējiem lipīdiem. Pievienojot broilercāļu barībai 2% sojas, 1% rapša eļļu, 1% linsēklu eļļu kombinācija un 0.1% lielu karotinoīdu saturošu kompleksu (2. grupa), omega-6 taukskābju līmenis paaugstinājās par 3.9% un omega-3 taukskābju līmenis par 2.9% un karotinoīdu saturs par 0.24 mg kg<sup>-1</sup> salīdzinot ar kontroles grupu (4.tab.).

Izēdinot broileriem taukskābēm bagātinātu barību, (2.grupa) ieguva par 195.92 kg inovatīva sastāva broilercāļu kautmasas (rēķinot uz 1000 broilieriem) vairāk nekā no broilieriem, kuri ēdināti ar tradicionāla sastāva barību (1. grupa). Neskatoties uz to, ka taukskābēm bagātinātās barības izmaksas 1000 broilera izaudzēšanai bija par 20 LVL augstākas nekā kontroles grupai, ieņēmumi par inovatīva sastāva gaļas realizāciju bija par 293.47 LVL lielāki (rēķinot uz 1000 broilieriem) nekā no kontrolers grupas. Lielākus ieņēmumus nodrošināja augstāka putnu saglabāšanās un lielāka iegūtā kopējā izaudzēto broilera dzīvmasa. Jānorāda, ka izmēģinājuma grupas broilera gaļa ar kontroli raksturojās ar augstāku omega-3 taukskābju saturu un optimālāku ω-6 : ω-3 taukskābju attiecību, tas ir, izmēģinājuma grupas broilera gaļai bija visaugstākā kvalitāte un arī 42 dienu vecumā augstākā broilera dzīvmasa. Tātad pat pie vienādas broilera realizācijas cenas ir iegūts augstvērtīgāks, cilvēku veselībai veselīgāks inovatīvs produkts, un kopējie ieņēmumi ražotājam varētu būt par 15% lielāki nekā standarta broilercāļu ēdināšanas gadījumā. Lai izvērtētu inovatīva sastāva broilercāļu gaļas ražošanas ietekmi uz apkārtējo vidi – analizēja kopproteīna un fosforu saturošo savienojumu daudzumu putnu mēšlos (5.tab.).

**Broilercāļu mēsļu ķīmiskais sastāvs**  
**Chemical composition of broiler chicken manure**

Rādītāji Parameters	Grupās Group		± pret kontroli ± to control
	1. Grupa – kontrole 1 <sup>st</sup> group -control	2. Izmēģinājuma grupa 2 <sup>nd</sup> trial group	
Nitrāti, mg/kg Nitrate, mg/kg	3.96	3.53	-0.43
Kokslāpekļa substance, % Nitrogen substance, %	0.35	0.34	-0.01
Kopproteīns, % Total protein, %	2.21	1.98	0.23
Kopējais fosfors, % Total phosphorus, %	0.28	0.25	-0.03

Aprēķinot broilercāļu mēšlos izdalīto nesagremoto un neizmantoto slāpekļvielu, koproteīna un fosfora daudzumu, konstatējām, ka izēdinot barību ar paaugstinātu omega-6 un omega-3 polinepiesātināto taukskābju daudzumu nesagremoto un neizmantoto slāpekļvielu, kopproteīnu, nitrātu un fosfora daudzums broilercāļu mēšlos bija līdzvērtīgs salīdzinot ar kontroles grupas broilercāļiem (5.tab.). Inovatīva sastāva broilercāļu gaļas ražošana praktiski neietekmēja apkārtējo vidi un neradīja nesagremojamības un neizmantojamības dēļ izēdinātās barības papildus ekonomiskos zaudējumus.

### SECINĀJUMI

1. Pievienojot broilercāļu barības sastāvā dažādu augu eļļu īpatsvaru un to savstarpējās kombinācijas, secināts, ka palielinās polinepiesātināto taukskābju (omega-6 un omega-3) daudzums broilercāļu gaļā, augstāka broilercāļu produktivitāte, ja broilera pamatbarībai pievieno 2% sojas eļļu, 1% rapšu eļļu, 1% linsēklu eļļu kombinācija un 0.1% karotinoīdus saturošu kompleksu.
2. Iegūtā inovatīvā sastāva broilercāļu gaļa ar paaugstinātu omega-6 (linolskābes 3.9%) un omega-3 (linolēnskābes 2.9%) taukskābju daudzumu, kas ir kvalitatīvāka, augstvērtīgāka un veselīgāka cilvēku uzturā.
3. Realizējot inovatīva sastāva broilercāļu gaļu ieņēmumi par 293.5 LVL vairāk (rēķinot uz 1000 broilercāļiem) nekā kontroles grupai.
4. Inovatīva sastāva broilercāļu gaļas ražošana negatīvi neietekmē apkārtējo vidi.

### LITERATŪRA

1. Aro, A. Diet Associated Changes in Coronary Heart Disease Mortality. No: Lopkopības produktu nekaitīgums, kvalitāte un kontroles metodes. Starptautiskās zinātniskās konferences materiāli, Sigulda, 2000. gada 15. Septembrī: 31 – 33.
2. Baidoo, S.K. Environmental impact of swine, poultry nutrition discussed. Feedstuffs 2000; (June 26): 12-15.
3. Blair, R., Jacob, I.P., Ibrahim, S., Wahg, P. Diets for nitrogen use to minimize nitrogen pollutions from poultry caste. Journal of Applied Poultry Research 8. 1999; 25-47.
4. Bodnieks, E. Funkcionālās pārtikas klīniskie aspekti. P.Stradiņa KUS, Gastroenteroloģijas centrs, Rīga, 23. aprīlis 2008. gads.

5. Coelho, M.B. Zoological nutrition; a costly or smart more? *Feedstuffs*. 1999; (June 10) 66:13-15.
6. Harris, C. Meat products are perfect as functional foods. In: *Meat Processing*. 2000; Jan/Feb, p.19.
7. Holub, B.J. Clinical nutrition: 4. Omega – 3 fatty acids in cardiovascular care. In: *Can. Medical. Assoc. J.* 2002; 608-615
8. Nahm, K.H. Evolution of the nitrogen content in poultry manure. *World's Poultry Science Journal* 59: 77-88.
9. Surai, P.F. Organic selenium and the egg: Lessons From nature. *In: Feed Compounder*. 2000; 20: 16-18.
10. Zariņš, Z., Neimane, L. No: *Uztura mācība*. Rīga. 2000. 21-29: 99-103.
11. Wathes, C.M. Aerial emission from poultry production. *World's Poultry Science Journal*. 1998; 54: 1-11.
12. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. In: *WHO Technical report series, 916*. World Health Organization, Genova, 2003; 54-60.
13. Ross Broiler Management manual. In: *Management essentials*. Ross Breeders Limited, Newbridge, Scotland, UK 2002; 33-35

# LATVIJAS BRŪNĀS ŠĶIRNES GOVJU PIENA MIKROBIĀLĀS PIESĀRŅOTĪBAS VĒRTĒJUMS PĒC TO ĢENĒTISKĀS IZCELSMES

## LB BOVINE MILK MICROBIAL CONTAMINATION EVALUATION BY RESEARCHING THEIR GENETIC ORIGIN

**Inese Dūjina, Aleksandrs Jemeljanovs, Ināra Helēna Konošonoka**

LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvija  
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra” Latvia  
[sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

### ABSTRACT

The most important target in dairy husbandry in the world is to harvest high quality, unpolluted milk. The most important measure in cultivation of dairy cow herd is to choose the correct genotypic and phenotypic brood stock for crossing. The aim of the research work is to analyze the fresh milk of different bulls' daughters, to find cows the effects of cows' genetic predisposition on microbial contamination, and somatic cell count (SCC) in milk. We can find in literature describing increasing resistance to some diseases like leukemia, tuberculosis, brucellosis, mastitis, foot disorders. This indicates that the genetic resistance and the animal's genetic immunity to diseases is found. Experimental work was carried in breed Latvijas Brūnās (LB) dairy cows shed which belongs to SIA Palsa and is situated in civil parish Varini, Smiltene county in year 2008/2009. It is compared seven different bulls daughters microbial contamination of fresh milk and SCC. Comparing SCC samples between the lines of bull daughters researching average value of the uniformity of dispersion analysis, observed that the SCC was statistically significantly different ( $F = 2.1$ ,  $p > 0.05$ ) in different lines of bull daughters. But at the same housing and feeding conditions in two breeding bulls daughter groups drastically changed the common bacteria and coagulase negative number of bacteria in raw milk, indicating the resistance of different cows, after assessing the genetic background.

**KEY WORDS:** cow's milk, microbial contamination, predisposition.

### IEVADS

Latvijas Republikā viena no visplašāk attīstītajām lauksaimniecības nozarēm ir piena lopkopība, kurā piena ieguvei 2009.gadā izmantoja 75% Latvijas Brūnās (LB) šķirnes govīs. Tādēļ mūsu pētījumos izvērtētas LB šķirnes govīs, kuros skaidrota ģenētiskās tesmens slimību rezistences pārmantojamība tieši pa buļļu līnijām. Piena ieguvē visā pasaulē ļoti aktuāls jautājums ir iegūtā svaigā piena kvalitāte. Piena iepirkšanas uzņēmumi regulāri nosaka piena kvalitātes rādītājus – baktēriju kopskaitu un SSS, bet nediferencē mikrobiālo piesārņojumu. Izslauktajā pienā var atrasties cilvēkam kaitīgi mikroorganismi: *Salmonella* spp., *Listērijas*, koagulāzes negatīvie stafilokoki, koliformas un *Enterococcus* spp. Par stafilokoku izplatību Latvijā liecina pētījumi, ka no slimo govju piena visbiežāk izdalītā mikroflora ir *Staphylococcus aureus* 62.5 %, *Streptococcus agalactiae* 21.88%, *Escherichia Coli* 12.50%, kuri ir ciešā saistībā ar vaislas buļļu meitām, izvērtējot rezultātus pa līnijām (Jemeljanovs

u.c.,1998). *Staphylococcus aureus* ir izturīgs pret sanitārās higiēnas pasākumiem, izturīgs ārējā vidē, ilgstoši saglabājas slaukšanas iekārtās (Myllys, 1995).

**Darba mērķis:** noteikt atsevišķu LB šķirnes vaislas buļļu līniju meitu predispozīcijas piena mikrobiālai kontaminācijai,

#### **Darba uzdevumi:**

noteikt atsevišķu vaislas buļļu meitu pienā:

1. somatisko šūnu skaitu (SŠS),
2. svaiga piena bakteriālo piesārņojumu,
3. noteikt LB šķirnes vaislas buļļu līnijas meitu.predispozīciju. piena bakteriālai piesārņotībai,
4. noteikt LB šķirnes vaislas buļļu līnijas, kuras ir predisponētas saslimšanai ar mastītu un paaugstinātu SŠS.

#### **MATERIĀLS UN METODIKA**

Svaiga piena paraugi tika iegūti vienā no Smiltenes novada LB šķirnes slaucamo govju novietnē 2008/2009.gadā no 52 govīm. Dažādu šķirņu buļļu meitas izvēlētas apzināti, lai varētu salīdzināt un noteikt rezultatīvākos vaisliniekus pēc dažādām genotipa un fenotipa pazīmēm, novērtējot katra buļļa meitu grupu un salīdzinot rezultātus. Paraugi iegūti rīta slaukšanas reizē, pēc slaukšanas aparāta noņemšanas un pupa gala dezinfekcijas. Paraugi nogādāti laboratorijā aukstuma somā 5°C temperatūrā. Svaiga piena paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana veikta LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta „Sīgra”, Bioķīmijas un mikrobioloģijas zinātniskajā, sertificētajā laboratorijā (LATAK reģistrācijas Nr. LATAK-T-038-07-99-A) saskaņā ar LVS EN ISO standartu metodikām. Svaigā pienā noteikti sekojoši rādītāji: kopējais baktēriju skaits, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Enterococcus spp.*, izolēti *Staphylococcus aureus*, koagulāzes negatīvie stafilokoki, *Escherichia coli* un koliformas. Datu matemātisko apstrādi veicām, izmantojot matemātiskās statistikas metodes (vienfaktoru un daudzfaktoru dispersijas analīzi), izmantojot MS Excel datorprogrammu, nosakot iegūto datu būtiskumu. Slaucamo govju produktivitātes rādītāji, SŠS (noteikts pēc metodes ISO 13366 – 3:1997), buļļu asinības rādītāji iegūti no V/A „Lauksaimniecības datu centrs”(V/A LDC) datu bāzes. Darbā izmantoto buļļu asinība attēlota 1.tabulā.

1.tabula/Table 1

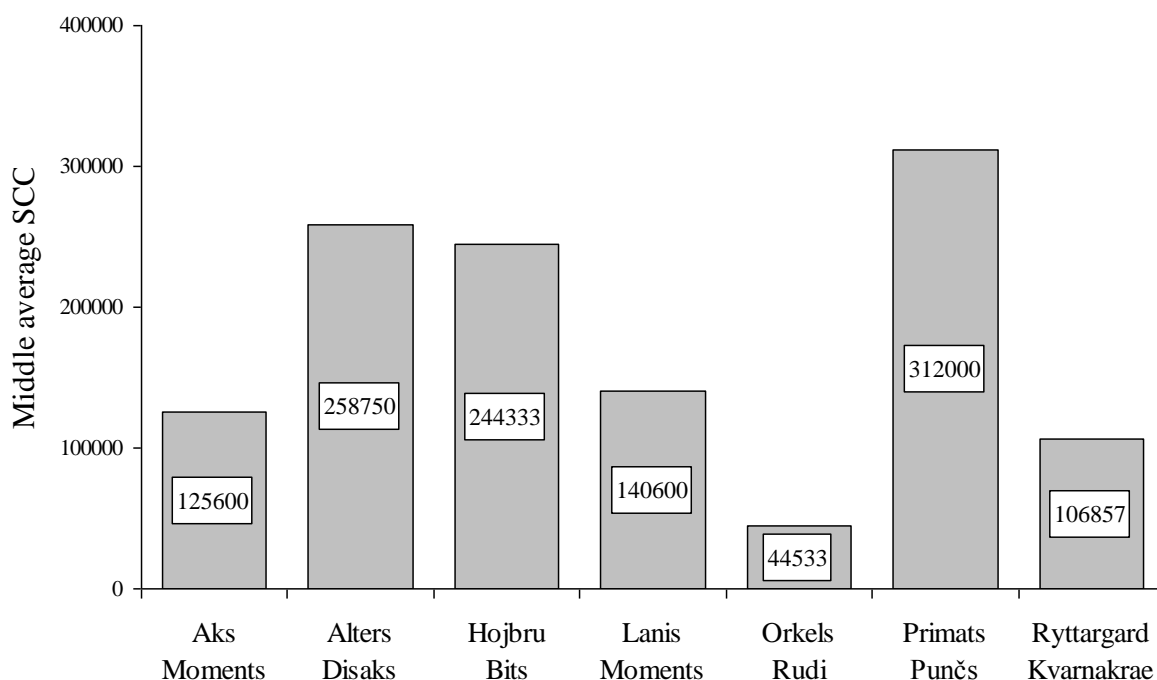
#### **Ekspērimētā izmantoto buļļu asinības rādītāji The bloodiness indicators of bulls, used in experiment**

Bullis/ Bull	Alters Disaks	Primats Punčs	Hoibru Bits	Aks Moments	Lanis Moments	Ryttargard Kvarnakra	Orkels Rudi
Asinība	DS	DS	DS	HS 50.00	HS 50.00	ZS 87.50	AN
%	68.75	75.00	59.37	DS 43.75	DS 25.00	NS 12.50	50.00
Blodiness	ŠV	ŠV	ŠV 4.38	ŠV 6.25	ŠV 25.00		HS
%	31.25	25.00	HS 6.25				50.00

1.tabula - izmantoto 7 buļļu grupu šķirnes asinības rādītāji %. Šķirņu nosaukumi: DS – Dānijas sarkanā (Danish Red), ŠV–Švices(Schwyz), HS–Holšteinas sarkanraibā(Holstein Red), ZS–Zviedru sarkanraibā(Sweden Red and white), NS–Norvēģu sarkanā, AN–Angleras (Angler) šķirne. Dzīvnieks noteiktajai šķirnei pieskaitāms, ja 75% izcelšanās nāk no šīs šķirnes asinības (Brunovska M., Līdaks M., 2009; V/A LDC).

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Viens no piena kvalitātes rādītājiem ir SŠS pienā. Pienā somatiskās šūnas atrodas vienmēr, bet to skaits ir tesmeņa veselības raksturotājs. SŠS pienā ietekmē veselības stāvoklis, ģenētiskā predispozīcija, slaukšanas veids un laiks, laktācijas periods, gadalaiks, dzīvnieku produktivitāte, dzīvnieku vecums. Pārbaudot statistisko hipotēzi par izlašu vidējo vērtību vienādību ar dispersiju analīzi noskaidrojām, ka dažādu bulļu meitu piena vidējais somatisko šūnu skaits statistiski būtiski neatšķiras ( $F=2.1$ ;  $p>0.5$ ). Eksperimenta govju grupu SŠS 1 ml piena 2008.gada vidējie rādītāji attēloti 1.attēlā.

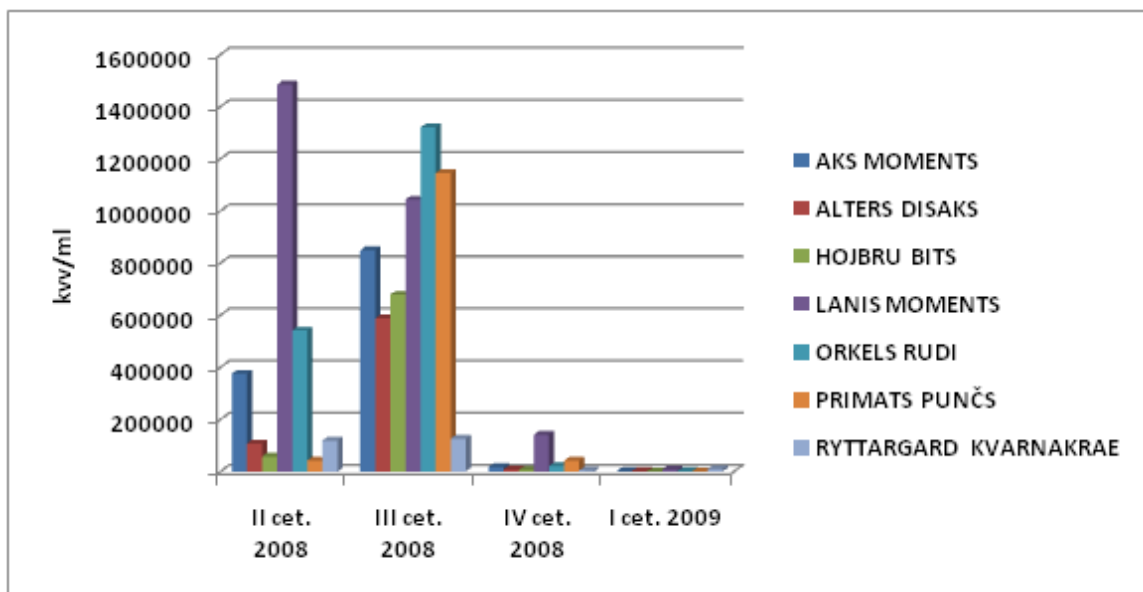


1.attēls. **Dotas SŠS vidējās vērtības norādīto bulļu meitu pienā 2008.gadā**  
Figure 1. **Bulls' daughters' average values of SCC in milk in year 2008**

Vaislas bulļa Orkels Rudi meitu zemākais vidējais grupas SŠS bija 44 533; 2. zemākais SŠS bija bulļa Ryttagard Kvarnakra meitām – 106 857 vienā ml piena. Labi SŠS rādītāji ir vaislas bulļa Aks Moments –125 600 un Lanis Moments –140 600 bulļu meitu grupām. Augstākie SŠS rādītāji konstatēti bulļiem ar DS šķirnes asins pārkumu, piemēram, Hojbru Bits meitu grupā vidējais SŠS bija 244 333; Alters Disaks meitu grupā vidējais SŠS bija 258 750; Primats Punčs meitu grupā vidējais SŠS bija 312 000 vienā ml piena. Šie dati apstiprina pieņēmumu, ka ar vaislas bulļu selekcijas palīdzību ir iespējams izlasīt īpatņus, kuru meitas uzrāda labākus produktivitātes rezultātus, kā arī mazāk slimo ar mastītiem, (Strautmanis, 2003; Schukken, 1992; Sanore, 2000; Olesen, 2000). Salīdzinot iepriekšējo autoru pētījumu rezultātus 2005.gadā darbā “Bulļu iedzimtības ietekme SŠS izmaiņām meitu pienā” ar augstāk minētajiem rādītājiem, vērojama sakritība, ka mazākais SŠS salīdzinot sarkano govju šķirnes, bija Zviedru sarkanraibā (ZS) bulļu meitu pienā. Lielākais piena tauku daudzuma indekss ir govju grupām Angleras(AN) x LB šķirņu asinību, tīršķirnes LB un ZS, Latvijā augstākais tauku saturs pienā starp sarkanajām šķirnēm ir AN šķirnes govīm. Viszemākais tauku saturs ir tīršķirnes DS govju grupai. (Strautmanis, 1997).

Lai izvērtētu dažādu līniju buļļus, noteiktu to ģenētisko pārmantojamību jeb rezistenci uz piena mikrobiālo piesārņotību, kopā ir izmeklēti 7 buļļu 52 meitu 174 svaiga piena paraugi. Kopējais baktēriju skaits noteikts katrā izmeklētajā svaiga piena paraugā. Izmeklējuma rezultāts parāda, ka no visiem paraugiem *Salmonella spp.* nav konstatēta, *Listeria spp.* izolēta 1 paraugā, *Staphylococcus aureus* 3 svaiga piena paraugos (vienai govij 2x), *Staphylococcus* ģints jeb koagulāzes negatīvie stafilokoki izolēti 167 svaiga piena paraugos, koliformas 17 svaiga piena paraugos, *Enterococcus spp.* - 75 paraugos. Izteikti augstais *Staphylococcus* ģints jeb koagulāzes negatīvo stafilokoku izolēšanas skaits - 167 svaiga piena paraugos, lika pievērst uzmanību SŠS, izslaukuma un koagulāzes negatīvo stafilokoku sakarībai. Papildus 5 slaucamajām govīm ar paaugstinātu SŠS iegūtajos piena paraugos tika izolēti *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (hemolizējošais), vides stafilokoki, gramnegatīvā mikroflora (Joffe u.c. 2006). Bīstamāks piena piesārņojums ir patogēnie mikroorganismi: salmonellas, listērijas, mezofilās baktērijas, pienam raksturīgie mikrokokki, koliformas un enterokoki, mastītus izraisošie, dažādie stafilokoki, kā arī piena patērētājam bīstamie piena piesārņotāji: dizentērijas ierosinātājas šigellas un salmonelozes ierosinātāji. (Konošonoka, Jemeljanovs, 2007; Konošonoka u.c. 2008). Dzīvnieku selekcijas sekmīgai īstenošanai praksē, nepieciešams izdalīt gan izturīgus, gan uzņēmīgus šķirņu pārstāvjus, diferencēt atsevišķus dzīvniekus vai radniecīgas dzīvnieku grupas, kuri saslimst vai nesaslimst ar mastītiem, leikozi, vai ir neauglīgi. Tomēr attiecīgās pazīmes determinējošo gēnu ir grūti noteikt., tāpat kā grūti noteikt krasu robežu starp ģenētiski mantoto rezistenci vai slimības uzņēmību (Petuhovs u.c., 1985).

Tabulas 2. rādītāju kopējais baktēriju skaits uzskatāmi parādīts attēlā 2.

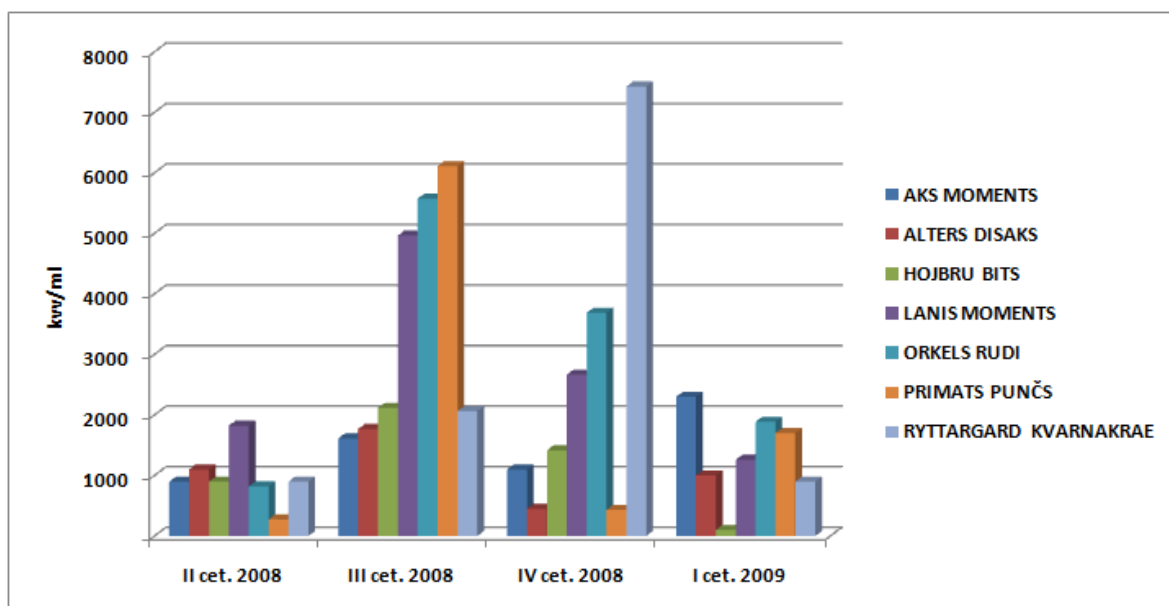


2. attēls. Kopējais baktēriju skaits kvv ml<sup>-1</sup> buļļu meitu pienā 2008. un 2009. gadā  
Figure 2. The total number of bacteria in cfu ml<sup>-1</sup> in milk of daughters of bulls in year 2008 and 2009

2008./2009. gada rādītāji iegūti no 174 paraugiem, ar lielāko kopējo baktēriju skaitu - buļļa Laņa Momenta meitām aprīļa un jūnija mēnesī – 1 484 889 kvv ml<sup>-1</sup> piena. Salīdzinot ar SŠS skaitu, varam secināt, ka tas bija lielākais SŠS, kuru maksimālā vērtība bija 378 000 1 ml piena. Šis kopējo baktēriju skaits Laņa Momenta meitām konstatēts jūnija mēnesī, ganību periodā. Laņa Momenta meitas raksturīgas ar izteikti



lieliem, zemiem tesmeņiem, lieliem, resniem pupiem, slaukšanai mīkstas, plašu pupu atveri un lielu piena strūklas izdalīšanos slaukšanas laikā. Laņa Momenta meitu grupā ir 10 dzīvnieki, kas bija viena no vecākajām izmēģinājuma govju grupām (Butkus un Butkus, 1985). 2009. gadā Laņa Momenta 4 meitas no izmēģinājumu grupas saslimušas ar mastītu un likvidētas, tas liek domāt par Laņa Momenta meitu zemo rezistenci pret slimību ierosinātājiem un mastīta ģenētisko predispozīciju, kas pārmantota pa tēva līniju. Pēdējos gados aktuāls ir jautājums par koagulāzes negatīvo stafilokoku piesārņojumu svaiga piena paraugos. Koagulāzes negatīvie stafilokoki visbiežāk izraisa subklīniskos tesmeņa iekaisumus bez redzamām klīniskām izmaiņām un tiem raksturīgo somatisko šūnu skaita palielināšanos un izslaukuma samazināšanos. Par koagulāzes negatīvo stafilokoku izraisīto mastītu izplatību literatūrā atrodami dati, ka Norvēģijā, Zviedrijā, Somijā koagulāzes negatīvie stafilokoki ierosina vairāk nekā 30% subklīnisko mastītu un līdz 20% klīnisko tesmens iekaisumu. Mūsu pētījumā koagulāzes negatīvos stafilokokus izdalījām no klīniski veselu govju svaiga piena paraugiem (attēls 2.).



3. attēls. Koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits kvv ml<sup>-1</sup> bulļu meitu pienā 2008. un 2009. gadā

Figure 3. The total number of coagulate negative staphylococci cfu ml<sup>-1</sup> in bulls' daughters milk in years 2008 and 2009

Kā redzam attēlā 3., koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits pienā palielinājies augusta un septembra mēnešos iegūtajos piena paraugos visām izmēģinājuma govju grupām. Novietnē nomainīti pakaiši – zāģu skaidu vietā govis kaisa ar iepriekšējā gada sliktas kvalitātes ziemāju salmiem. Barības devā slaukšanas laikā turpina piebarot iepriekšējā gada skābsienu, gaisa temperatūra pazeminājusies, naktis govis pavada nakts aplokā pie fermas. Rezultātā vaislas bulļa Primats Punčs meitām visvairāk palielinājies koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits pienā - 6113 kvv ml<sup>-1</sup>, septembra mēnesī Primats Punčs meitām strauji paaugstinājies SŠS, līdz 981 000. Orkels Rudi koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits 5575 kvv ml<sup>-1</sup>, Lanis Moments - 4967 kvv ml<sup>-1</sup>. Vaislas bulļa Aks Moments koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits, salīdzinot otrā ceturkšņa un trešā ceturkšņa rezultātus, palielinājies gandrīz divas reizes no 898 kvv ml<sup>-1</sup> uz 1612 kvv ml<sup>-1</sup>. Vaislas bulļa Aks Moments SŠS meitu pienā 2008. gada ceturtajā ceturksnī

(oktobra – decembra mēnesī) strauji palielinājās - 981 000 vienā ml piena. Pārējo buļļu meitu grupās, palielinoties koagulāzes negatīvo stafilokoku skaitam pienā, SŠS pienā nav būtiski mainījies. Atsevišķu buļļu līniju meitām SŠS neizmainījās. Lielāks koagulāzes negatīvo stafilokoku skaits izraisa govju imūnsistēmas krasāku atbildes reakciju, kas rezultējās SŠS pieaugumā (Konošonoka, 2005).

#### SECINĀJUMI.

1. Vidējais somatisko šūnu skaits pienā statistiski ticami neatšķiras atsevišķu LB šķirnes buļļu meitām. Zemākais SŠS konstatēts vaislas buļļa Orkels Rudi meitām un augstākais SŠS vaislas buļļa Primats Punčs meitām vienā ml piena. Pasliktinoties ēdināšanas, turēšanas un klimatiskajiem apstākļiem SŠS krasi palielinās divu – Alters Disaks un Primats Punčs līniju buļļu meitu pienā.
2. Lielākais kopējo baktēriju skaits svaigā pienā ir vaislas buļļa Laņa Momenta meitām un vaislas buļļa Orkels Rudi meitām.
3. Koagulāzes negatīvo stafilokoku piesārņojums septembra mēnesī ievērojami palielinās Lanis Moments(HS 50.00%, DS 25.00%, ŠV 25.00%), Orkels Rudi(AN 50.00%, HS 50.00%) un Primats Punčs(DS 75.00%, ŠV 25.00 %) līniju buļļu meitu pienā, bet decembra mēnesī Ryttagard Kvarnakrae(ZS 87.50%, NS 12.50%) līnijas buļļu meitu pienā – tas liek domāt par samazinātu buļļu meitu rezistences ģenētisko potenciālu.

#### LITERATŪRA

1. Brunovska, M., Līdaks, M. *Latvijas Brūnās šķirnes govju ģenētisko resursu saglabāšanas programma* (Latvian Brown breed cows genetic resources conservation program). Rīga, 2009;12.
2. Jemeljanovs, A., Mozgis, V., Blūzmanis, J., Jonins, V., Reine, A. *Govju akūtais tesmeņa iekaisums un tā izraisītāji*. (Cows' udder acute inflammation and it's reasons). Latvijas Veterinārārstu biedrības, LLU Veterinārmedicīnas fakultātes, Latvijas Republikas Valsts Veterinārā dienesta kopīgi veidots zinātniski praktiskais izdevums *Veterinārmedicīnas raksti '98*. Jelgava, 1998; 67 – 71
3. Joffe, R., Birģele, E., Baranovičs, E. The prevalence of enterotoxins producing staphylococcus aureus strains in milk products marketed in Latvia *Starptautiskās zinātniskās konferences raksti*. Jelgava, 2006; 112 – 119
4. Konošonoka, I. H., Jemeljanovs, A., Ikauniece, D. Svaiga govju piena mikrobiālā kvalitāte un to ietekmējošie faktori (Microbiological quality of cow's raw milk and it's affecting factors). In: Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sagra” of Latvia University of Agriculture *Proceedings of International Scientific Conference*. Sigulda, 2008; 123 – 127.
5. Konošonoka, I. H. *Govju piena mikrobiālā kontaminācija un izolētās mikroorganismu asociācijas*. (Microbial contamination of cow's milk and isolated association of microorganisms) Sigulda, 2008; 56.
6. Mylly, V. *Effect of Abrasion of Teat Orifice Epithelium on Development of Bovine Staphylococcal Mastitis*. Staphylococcal mastitis in heifers and dairy cows. Helsinki, 1995; 446-452.
7. Olesen, M. *Nye indekser for mastitis og vrige sygdomme*. (Breeding values estimation of somatic cell count) *RDMnyt* 2000; 339.
8. Sanore, A.B. Breeding values estimation of somatic cell count in the Italian Holstein. 51 st *Animal Meeting of the EAAP*, 2000; 51.

9. Schukkan, Ontario bulk milk somatic cell count reduction programm. *Journal of Dairy Sci*, 1992; 75: 12: 3352 – 3358.
10. Strautmanis, D. Latvian Brown dairy breed in current situation. *Proceedings of the 3rd Baltic Animal Breeding Conference*, Riga, 1997; 46 – 47.
11. Strautmanis, D. Dažādo govju šķirņu ietekme uz LB šķirnes buļļu māšu kandidāšu ražības ciltsvērtības indeksiem (Some dairy breeds influence on breeding valume indexes of Latvian Brown bull mothers candidates), *Agronomijas Vēstis, Latvian Journal of Agronomy* Nr. 5. Jelgava, LLU, 2003; 254 – 258.
12. Valsts aģentūra "Lauksaimniecības datu centrs" datu bāze, (Database) Latvija, Available at: [www ldc.gov.lv/dzreg2.php](http://www ldc.gov.lv/dzreg2.php) 10 March 2009.
13. Буткус, К., Буткус, П.. Влияние аномального молока на качество сыра (Effect of abnormal milk to cheese quality), *Агрпромиздат* Москва, 1985; 78.
14. Петухов, В.Л., Жигачев, А.И., Назарова, Г.А.. Ветеринарная генетика с основами *вариационной статистики* (Veterinary Genetics with the basics of variation statistics), *Агрпромиздат*, Москва, 1985; 367.

**STRAUSU (*STRUTHIO CAMELUS VAR. DOMESTICUS*) TIEVĀS  
UN RESNĀS ZARNAS MORFOMETRISKIE RĀDĪTĀJI  
PERINATĀLAJĀ PERIODĀ**

**MORPHOMETRIC INDICES OF THE SMALL AND LARGE  
INTESTINE DURING PERINATAL PERIOD IN THE OSTRICH  
(*STRUTHIO CAMELUS VAR. DOMESTICUS*)**

**Ilmārs Dūrītis, Arnis Mugurēvičs, Lauma Latkovska**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Preklīniskais institūts, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Preclinical Institute, Latvia

[ilmars.duritis@llu.lv](mailto:ilmars.duritis@llu.lv)

**ABSTRACT**

The aim of this research is to find out morphometric indices of the small and large intestine of the ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days. Forty-two individuals of African ostriches of both sexes bred on the ostrich farm *Ozoliņi AB*, Jekabpils region, Latvia, were used in the present research; 6 of them were embryos at the 38<sup>th</sup> day of incubation, and 36 chicks – 1, 3, 7, 14, 30 and 60 days old, 6 individuals in each group.

The absolute total weight, the absolute and relative weight of the small and large intestine separately were estimated, as well as the absolute and relative intestinal length was measured.

The absolute total weight of intestines in chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days increases 67 times, i.e. from  $8.81 \pm 1.00$  g to  $593.64 \pm 82.66$  g. The relative intestinal weight increases linearly up to 30 days of age, while at the age of 60 days a significant decrease of the relative intestinal weight is observed.

The total length of intestines in ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days increases 6.7 times, i.e. from  $1188 \pm 67$  mm to  $7947.00 \pm 773.67$  mm. With the increase of the age of ostrich chicks, the relative length of the small intestine tends to decrease, the relative length of the large intestine, in its turn, tends to increase.

**KEY WORDS:** ostrich, intestine, weight, length.

**IEVADS**

Zarnu uzbūve mājputniem detalizēti pētīta jau pagājušā gadsimta vidū, taču par strausa zarnu traktu, īpaši par zarnu attīstību ontogēnēzē, ir samērā maz pētījumu. Āfrikas strausam (*Struthio camelus var. domesticus*), zarnu trakta anatomiskajā uzbūvē vērojama virkne būtisku īpatnību, kas saistītas ar šīs sugas dabīgās izplatības areāla klimatiskajiem apstākļiem (tuksnesis) un samērā augsto kokšķiedras īpatsvaru barībā (Sales, 2006). Salīdzinoši ar citām putnu sugām strausveidīgajiem putniem raksturīga labi attīstīta resnā zarna, kas pieaugušam Āfrikas strausam veido apjomīgāko daļu no kuņģa-zarnu trakta (Bezuidenhout, 1993; Fowler, 1991; Порченко, 2007) un, kā zināms, īpaši resnajai zarnai ir svarīga loma kokšķiedras fermentācijas procesos.

Šī pētījuma mērķis ir noskaidrot strausa cāļu tievās un resnās zarnas morfometriskos rādītājus no 38. embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījumā izmantoti 42 strausu fermā „Ozoliņi AB” (Jēkabpils rajons, Latvija) audzētu Āfrikas strausu abu dzimumu īpatņi no tiem seši embriji 38. inkubācijas dienā un 36 cāļi 1; 3; 7; 14; 30; 60 dienu veci, katrā grupā attiecīgi pa sešiem īpatņiem. Pirmās 3 dienas pēc izšķilšanās cāļi atradās šķilšanās skapī. Sākot ar četru dienu vecumu putni uzturējās apsildāmā boksā ar smilšu grīdu un šajā vecumā uzsākta to ēdināšana ar komerciālo strausu cāļu barību *Strus Premium - Strus 1*. Barība un ūdens tika nodrošināti *ad libidum*.

Pirms eitanāzijas attiecīgās vecuma grupas (7; 14; 30; 60d) putni tika 12 stundas badināti. Pēc tam tie tika narkotizēti izmantojot 0.5ml - 10% ketamīna un 0.5 ml - 2% ksilazīna šķīduma intramuskulāru injekciju un tad eitanizēti izmantojot 0.5 ml - 20% pentobarbitāla intrakardiālu injekciju. Pēc eitanāzijas katrs putna liķis tika nosvērts izmantojot elektroniskos svarus Kern 442-512N ( $\pm 1g$ ) un secēts, tālākai izmeklēšanai.

Noteicām zarnu kopējo absolūto masu, kā arī tievās un resnās zarnas absolūto masu izmantojot svarus Kern EW 420-3 NM ( $\pm 0,01g$ ) un attiecīgi aprēķinot relatīvo zarnu masu (attiecība pret ķermeņa masu). Pirms svēršanas orgānu saturs netika evakuēts.

Zarnu garuma noteikšanai izmantots lentmērs ( $\pm 1mm$ ). Zarnu relatīvais garums tika aprēķināts attiecinoši konkrētās zarnas garumu pret kopējo zarnu trakta garumu.

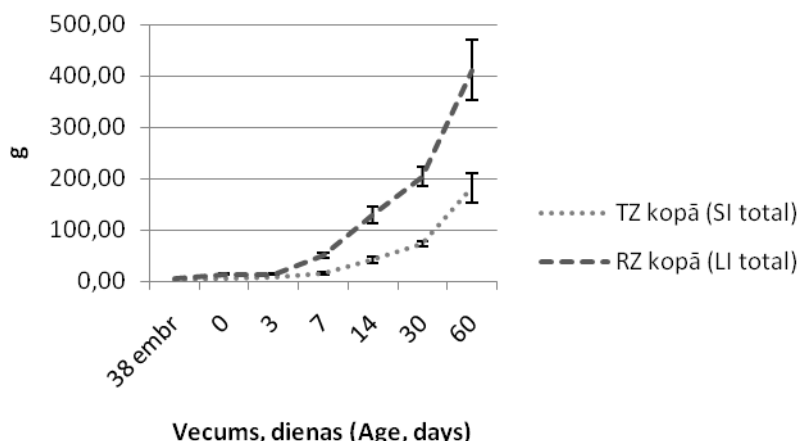
Pētījums veikts Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūtā. Pētījumā iegūtie dati statistiski apstrādāti izmantojot SPSS 11.5 programmu. Katram rādītājam aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība un standartklūda. Lai salīdzinātu vidējos rādītājus starp vecuma grupām izmantojām daudzfaktoru dispersijas analīzi ANOVA.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Tievās un resnās zarnas absolūtās masas pieaugums pirmajās dienās pēc izšķilšanās samērā lēns, taču straujš masas kāpums konstatēts pēc 3 dienu vecuma sasniegšanas. Šajā vecumā tiek uzsākta cāļu ēdināšana. Kopējā zarnas masa pētītajā perinatālās ontogēnēzes periodā strausu cāļiem palielinās 67 reizes (tas ir no  $8.81 \pm 1.00 g$  – 38.embr. attīstības dienā līdz  $593.64 \pm 82.66 g$  – 60. dienā), bet zarnu trakta garums pieaug 6.7 reizes (tas ir no  $1188 \pm 67mm$  – 38.embr. attīstības dienā līdz  $7947.00 \pm 773.67mm$  - 60.dienā.). Būtiskākais masas pieaugums konstatēts starp 3 un 14 dienu ( $p < 0.05$ ); 7 un 30 ( $p < 0.01$ ) un 30 un 60 dienu ( $p < 0.001$ ), bet būtiskākais garuma pieaugums starp 7 un 14 dienu ( $p < 0.05$ ); 14 un 30 dienu ( $p < 0.05$ ) un 30 un 60 dienu ( $p < 0.01$ ).

Nosakot tievās zarnas absolūto un relatīvo masu konstatējām, ka 38. embrionālās attīstības dienā tievās zarnas masa vidēji ir  $3.01 \pm 0.39 g$ , un tas veido  $0.33 \pm 0.04 \%$  no ķermeņa masas. Izšķilšanās dienā šie rādītāji bija pieauguši attiecīgi līdz  $5.81 \pm 0.45g$  un  $0.70 \pm 0.08 \%$  (1.un 2.att.).

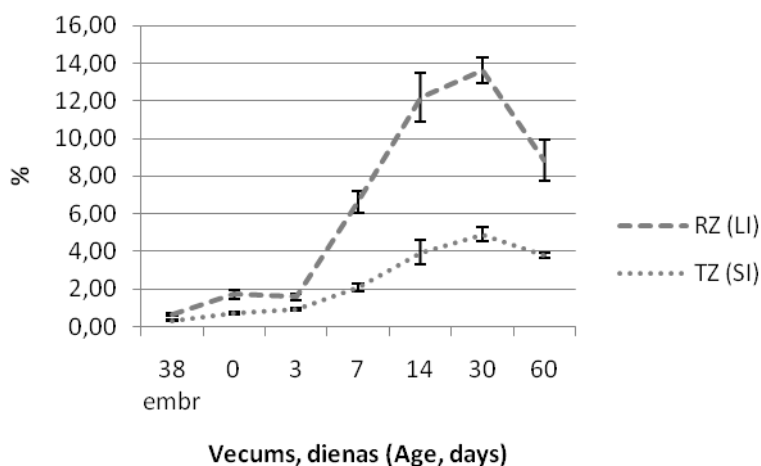
Tievās zarnas absolūtā masa turpina lineāri pieaugt visā pētītajā ontogēnēzes periodā. Starp 30. un 60. dzīves dienu tā palielinās 2.5 reizes ( $p < 0.001$ ) un sasniedz  $182.1 \pm 28.6 g$  (1. att.).



1.attēls. Strausa cāļu tievās (TZ) un resnās zarnas (RZ) absolūtā masa (g±SEM) no 38.embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam

Figure. 1. The absolute weight (g±SEM) of the small intestine (SI) and large intestine (LI) in ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days

Pēc vairāku autoru pētījumiem tievās zarnas relatīvais svars 3 dienu vecumā strausiem sastāda 2.1%, 72 dienu vecumā 4.2 % (Iji et al., 2003), bet pieaugušam putniem 1.06 % (Порченко, 2007) no kopējā ķermeņa svara. Savukārt mūsu pētījumā iegūtie rezultāti uzrāda tievās zarnas relatīvās masas lineāru pieaugumu līdz 30 dienu vecumam (skat. 2. att.), kad tā sasniegusi savu maksimumu un sastāda jau 4.91% ± 0.37 % no ķermeņa masas, pie kam visstraujākais pieaugums vērojams tieši starp 7 un 14 dienu dzīves dienu ( $p < 0.01$ ). Salīdzinot ar trīsdesmito dienu, 60 dienu vecumā strausu cāļiem konstatēta tievās zarnas relatīvas masas samazināšanās līdz  $3.79 \pm 0.14$  % no ķermeņa masas (skat. 2.att.)

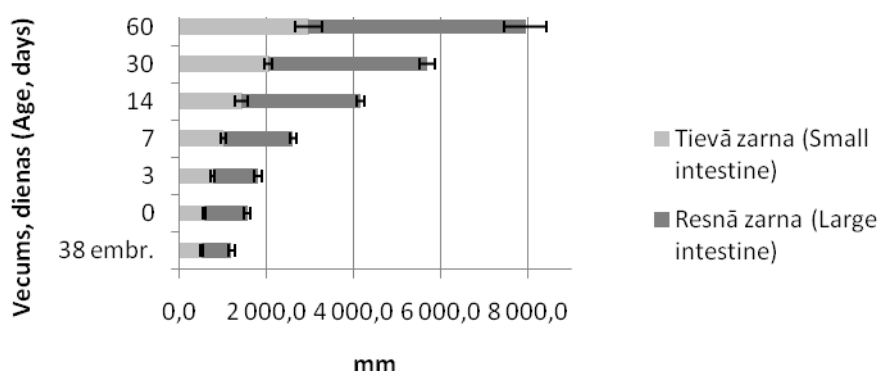


2.attēls. Strausa cāļu tievās (TZ) un resnās (RZ) zarnas relatīvā masa (% ± SEM) no 38. embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam

Figure 2. The relative weight (% ± SEM) of the small intestine (SI) and large intestine (LI) in ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days

Broileru cāļiem 35 dienu vecumā tievās zarnas relatīvais svars sastāda vairs tikai  $2.89 \pm 0.141\%$  no ķermeņa masas (Awad et al., 2009), bet savu maksimumu tas sasniedz jau 6 dienu vecumā (Uni et al., 1999).

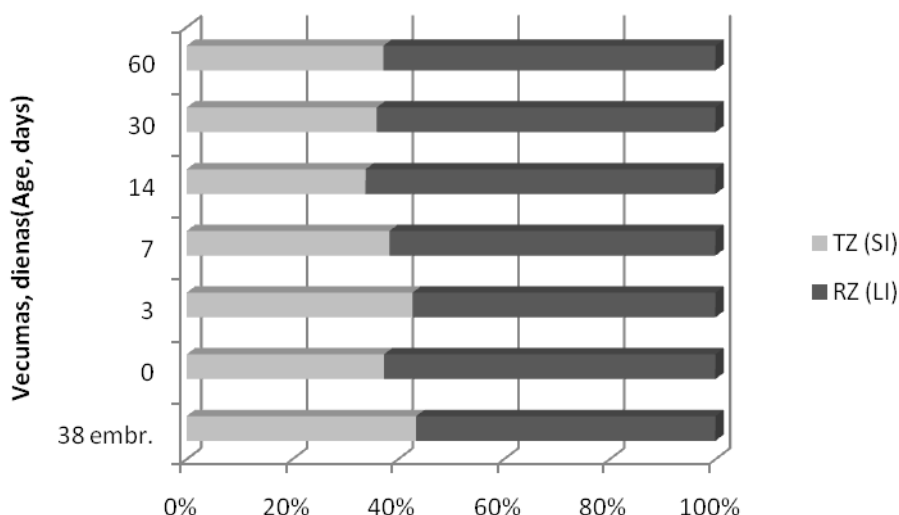
Analizējot tievās zarnas kopējo garumu konstatējām, ka 38. embrionālās attīstības dienā tas ir vidēji  $509.2 \pm 24.13\text{mm}$ , jeb  $43.4 \pm 2.04\%$  no kopējā zarnu garuma (skat. 3. un 4. att.). Strauja zarnas augšana garumā sākas pēc izšķilšanās, kad 7 dienu vecumā tās garums jau dubultoies un sastāda  $1001.7 \pm 65.52\text{ mm}$ , jeb  $38.4 \pm 1.10\%$  no kopējā zarnas garuma.



3.attēls. Strausa cāļu tievās un resnās zarnas garums (mm±SEM) no 38.embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam

Figure 3. The length (mm±SEM) of the small and large intestine in ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days

Tievās zarnas garuma īpatsvars (relatīvais garums) visiem izmeklētajiem cāļiem visās vecuma grupās svārstās no  $33.8 \pm 1.75\%$  14 dienu vecumā līdz  $43.4 \pm 2.04\%$  38. embrionālās attīstības dienā un tam novērojama tendence samazināties pieaugot cāļu vecumam (skat. 4. att.). Arī Fovlers (Fowler, 1991) konstatējis, ka tievās zarnas kopējais garums pieaugušam strausam ir 512 cm, kas sastāda 36% no kopējā zarnu garuma, bet 30 dienu vecumā attiecīgi 37%, kas norāda uz relatīvā zarnu garuma samazināšanos putnam pieaugot.



4.attēls. Strausa cāļu tievās (TZ) un resnās zarnas (RZ) relatīvais garums (%±SEM) no 38.embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam

Figure 4. The relative length (%±SEM) of the small (SI) and large intestine (LI) in ostrich chicks from the 38<sup>th</sup> day of embryonic development to the age of 60 days

Resnās zarnas absolūtā un relatīvā masa 38.embrionālās attīstības dienā sastāda attiecīgi  $5.8 \pm 0.62\text{g}$ , jeb  $0.65 \pm 0.07\%$  no ķermeņa masas. Izšķilšanās dienā resnās zarnas absolūtā masa jau gandrīz trīskāršojusies ( $14.34 \pm 1.55\text{g}$ ;  $1.73 \pm 0.25\%$ ), bet sākot ar 3. dzīves dienu tā pieaug daudz straujāk un 14. dienu vecumā ir palielinājusies 9 reizes sastādot vidēji  $129.60 \pm 16.94\text{g}$ ;  $12.17 \pm 1.29\%$  (skat.1. un 2. att.).

30 dienu vecumā resnās zarnas relatīvā masa sasniedz maksimumu sastādot  $13.63 \pm 0.71\%$  no ķermeņa masas, taču otrā dzīves mēneša beigās (60 dienu vecumā) novērojām būtisku relatīvās masas kritumu ( $p < 0.01$ ). Šajā periodā resnā zarna sastāda  $8.86 \pm 1.08\%$  no ķermeņa masas (skat. 2.att.). Resnās zarnas relatīvās masas izmaiņas dažādu vecumu strausu cāļiem atzīmējuši vairāki autori, tā trīs dienu vecumā resnās zarnas relatīvais svars sastāda 4%, 72 dienu vecumā 19.8% (Iji et al., 2003), bet pieaugušam strausam 3.17% (Порчеескы, 2007) no ķermeņa masas, šādu tendenci apstiprina arī mūsu pētījuma rezultāti.

Lielāko daļu no strausu cāļu zarnu garuma visās vecuma grupās sastāda resnā zarna. Ja 38.embrionālās attīstības dienā resnā zarnas garums ( $679.50 \pm 72.87$ ) tikai nedaudz pārsniedz tievās zarnas garumu, tad 14 dienu vecumā resnā zarna jau gandrīz divas reizes (1.9) garāka par tievo zarnu. Šajā vecumā tievās zarnas garums (mm) attiecīgi ir  $1423.67 \pm 138.49$  un resnās –  $2733.17 \pm 81.85$ , pie kam šī attiecība saglabājas arī 30 (1.8) un 60 (1.7) dienu veciem putniem (skat. 3. att.)

Resnās zarnas relatīvais garums pētījumā iekļautajiem strausu cāļiem svārstās no  $56.58 \pm 2.07\%$  (38.embrionālās attīstības diena) līdz  $66.15 \pm 1.76\%$  (14. diena), taču šīs izmaiņas nav būtiskas (statistiski ticamas). Resnās zarnas relatīvajam garumam tendence pieaugt līdz ar cāļa vecuma palielināšanos (skat. 4. att.).

Arī no citu autoru pētījumiem izriet, ka resnā zarna ir garākais zarnu trakta nodalījums, kā strausu cāļiem tā pieaugušiem strausiem. Vairāki autori, pētot strausu cāļu un pieaugušu strausu loka zarnas morfoloģiju, kas sastāda nozīmīgāko resnās zarnas daļu, konstatējuši, ka mēneša vecumā strausu cāļiem loka zarnas garums sastāda 1.6 m, jeb 57% no kopējā zarnu garuma (Cho et al.,1984; Fowler, 1991), bet pieaugušiem strausiem loka zarnas garums ir no 11 – 13 m, attiecīgi 57% no kopējā zarnu garuma (Порчеескы, 2007; Skadhauge, 1984; Fowler 1991).

## SECINĀJUMI

1. Strausu cāļu kopējā absolūtā zarnu masa no 38.embrionālās attīstības dienas līdz 60 dienu vecumam palielinās 67 reizes (t.i. no  $8.81 \pm 1.00\text{ g}$  līdz  $593.64 \pm 82.66\text{ g}$ ). Zarnu relatīvā masa lineāri pieaug līdz 30 dienu vecumam, 60 dienu vecumā novērojams būtisks zarnu relatīvās masas samazinājums;
2. Strausu cāļu kopējais zarnu garums no 38.embrionālās attīstības dienas līdz 60.dienai vecumam pieaug 6.7 reizes (t.i. no  $1188 \pm 67\text{mm}$  līdz  $7947.00 \pm 773.67\text{mm}$ ). Pieaugot strausu cāļu vecumam tievās zarnas relatīvajam garumam novērojama tendence samazināties, savukārt resnās zarnas relatīvajam garumam ir tendence palielināties.

## LITERATŪRA

1. Awad, W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S., Bohm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 2009; 88: 49-55.
2. Bezuidenhout, A. The Spiral Fold of the Cecum in the Ostrich (*Struthio Camelus*). *Journal of Anatomy*.1993; 183(Part 3): 587-592.



3. Cho, P., Brown, R., Anderson, M. Comparative gross anatomy of ratites. *Zoo Biology*.1984; 3: 133-144.
4. Fowler, M.E. Comparative clinical anatomy of ratites. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 1991; 22 (2): 204-227.
5. Iji, P.A., Van der Walt J.G., Brand T.S., Boomker E.A., Booyse D. Development of the digestive tract in the ostrich (*Struthio camelus*). *Arch. Anim. Nutr.*2003; 57(3): 217-228.
6. Sales, J. Digestive physiology and nutrition of ratites. *Avian and poultry biology reviews*. 2006; 17 (3): 41-55.
7. Skadhauge, E., Warü, C.N., Kamau, J.M.Z., Maloiy, G.M.O. Function of the lower intestine and osmoregulation in the ostrich: preliminary anatomical and physiological observations. *Quarter Journal of Experimental physiology*.1984; 69: 809-818.
8. Uni, Z., Noy, Y., Sklan, D. Posthatch development of small intestine function in the poult. *Poultry Science*.1999; 78: 215-222.
9. Порческу, Г.С. Сравнительная морфология пищеварительного тракта Африканского черного страуса, курицы и индейки. *Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук*, Кишинев – 2007; 40 стр.

# THE EXPERIMENTAL IRON DISORDERS OF THE LIVER AND SMALL INTESTINE

**Gundega Knipše<sup>1</sup>, Dmitrijs Babarikins<sup>2</sup>, Jurijs Markovs<sup>1</sup>, Nadežda Bērziņa<sup>3</sup>,  
Alise Grāmatniece<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, University of Latvia, Department of Anatomy and Histology

<sup>2</sup>Institute of Innovative Biomedical Technologies

<sup>3</sup>Agency of Latvian University “Institute of Biology of Latvian University”.

[gundegaknipse@lu.lv](mailto:gundegaknipse@lu.lv)

## ABSTRACT

Two feeding studies with rats and cockerels were conducted to evaluate the role of iron deficiency and overload in the morphofunctional changes in the liver and intestine. Administration of an iron – deficient diet to Wistar-Kyoto rats resulted within 20 days in significantly reduced serum iron concentrations, a hypochromic anemia, and increased intestinal villus height but no pronounced effects on cell proliferation was observed. The iron concentration in the liver of iron – deficient rats was found to increase. At the same time, the most common laboratory tests for the detection of liver injury – serum aminotransferases (ASAT and ALAT) were altered. We considered that moderate iron deficiency results in complex systemic disorders, including hypochromic anemia, duodenum mucosal hyperplasia and hepatocellular injury. Our observations emphasize also the importance of vacuolar compartmentalization in controlling iron fluxes in enterocyte and suggest that TRPV1- dependent iron uptake by subapical vesicles may play an important role in metal ion homeostasis of intestinal epithelium.

**KEY WORDS:** iron deficiency, iron overload, TRPV1 expression.

## INTRODUCTION

Iron is essential to life, because of its ability to donate and accept electrons. The most important group of iron-binding proteins contains the heme molecule, all of which contain iron at their centers. For example, animals use iron in the hemoglobin of erythrocytes. Iron is absorbed from food by enterocytes in the duodenum. It circulates in the bloodstream bound to transferrin and is delivered to sites of utilization and storage. In mammals the limited availability of soluble dietary iron is reflected in the lack of a true excretory system (iron is lost from the body through bleeding and sloughing of skin and mucosal cells) and the use of high affinity binding proteins for iron transport and storage. Iron deficiency and iron overload are among the most prevalent nutritional disorders worldwide. Severe iron deficiency results in complex systemic disorders including metabolism of energy and minerals. The role of iron deficiency as cause of liver and small intestine disfunction has never been studied in detail (8, 14). It should also be pointed out, that the data regarding villus height and crypt cell mitosis in such circumstances are still controversial (1, 10, 11). Other aspects of iron homeostasis, such as regulation of intracellular iron distribution, also remains largely unexplored. Experimental approaches to analyze these mechanisms have been considerably advanced by the discovery of mammalian homologs of the *Drosophila* transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1). TRPV1 is now known to be expressed not only in the peripheral sensory neurons, but also in the spinal cord, brain and wide-range of non-neural cells (e.g. enterocytes, urothelium, fibroblasts and hepatocytes) (2).

Therefore, the objective of present experimental study conducted on laboratory animals was to evaluate the duodenal morphometry, the extent of hepatocellular injury and iron status indices of rats with iron – deficiency anemia under controlled environmental conditions. We wished to examine also the role of TRPV1 in the intracellular iron compartmentalization within the enterocyte.

## **MATERIAL AND METHODS**

The effect of iron deficiency on liver and small intestine morphology have been studied in the first block of experiments. The experiment was carried out with 8 male rats Wistar-Kyoto, which were given a semi-synthetic ID-diet with suboptimal iron (3 mg iron per kg diet) over a total of 20 days. The study also included healthy control group (n=8) rats fed with the same diet, but enriched by iron - 270 mg iron/kg diet (7). Blood erythrocytes and hemoglobin were detected on ILAB-300 analyzer (Instrumentation Laboratory), and blood serum ASAT, ALAT - on Colter Hmx (Beckman) ones. Fe determinations in liver dry ashed material (heated to 480°C for 48h in silica crucibles), as well as in deproteinized blood serum were measured by flame atomic absorption spectroscopy (Perkin-Elmer, Analyst 700).

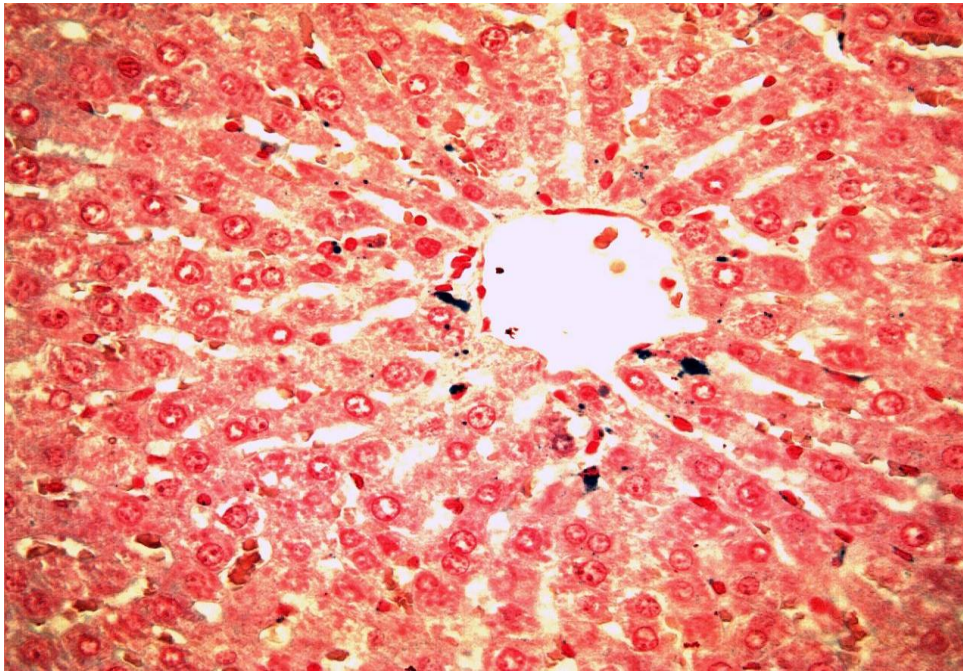
One-to-thirty-day old Lohmann Brown cockerels have been used to investigate the intracellular distribution of TRPV1 and compartmentalization of iron in intestinal epithelial cells. One-day-old birds were received from Latvian poultry manufacture 'BALICOVO'. Chickens were housed in cage units with free access to food and water. Animals were divided into two groups of seven heads in each. Birds of the first group were fed on a wheat-barely full-fed basal diet containing all the necessary nutrients (control). Chickens from the second group were provided with the same basal diet plus 1000 mg Fe/kg. At the end of the experiment, the 30-day-old nonfasted cockerels were killed by decapitation in accordance with the Recommendations for the Euthanasia of Experimental Animals of the Europe Convention. The abdomen was immediately opened, and the small intestine (duodenum) was dissected out. Each segment was washed out with an ice-cold saline solution (0, 9% NaCl, Merck, in nano-pure water), to remove food remnants. The experiments were approved by the local animal ethics committee.

Routine hematoxylin – eosin sections were prepared from formalin – fixed, paraffin – embedded tissues. Immunohistochemical studies were performed by indirect staining methods using antibodies against CD68 (macrophages), CD 235 (glycophorin A), and TRPV1. Perl's stain is used to detect stainable tissue hemosiderin. The mitotic index representing the percentage of cells in mitosis in the crypt was calculated. The length of villi in the duodenum was also measured. The datasets were statistically compared using the Student's unpaired test.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In the liver of control rats Perl's stain did not show the stainable tissue hemosiderin. Otherwise in experimental group Perl's stain showed the presence of hemosiderin in Kupffer cells and in some hepatocytes (Fig.1). Immunohistochemical analysis of liver specimens from iron – deficient rats revealed that CD235-positive erythrocytes are frequently aggregated around Kupffer cells. Some of these cells show erythrophagocytosis. These events was also accompanied with an accumulation of iron in the liver. Liver iron concentrations in the iron – deficient rats were 128% of control values (183.43 +/- 4.93 vs 236.8 +/- 6.31 micrograms/g dry tissue weight;  $p < 0.02$ ). Rats fed an iron – deficient diet were anemic. These rats had significantly lower mean serum iron concentrations (1.15 +/- 0.35 vs 41.25 +/- 19.72 micrograms/ml serum;  $p <$

0.01), and mean hemoglobin concentrations (10.10 +/- 0.54 vs 17.71 +/- 0.92 g/dL;  $p < 0.001$ ). Statistically insignificant decrease in the erythrocyte count was also observed (6.11 +/- 0.55 vs 7.93 +/- 0.66 million/mm<sup>3</sup>).



**Figure 1. Positive Perls' staining is localized to some Kupffer cells and hepatocytes**

A slight, but statistically insignificant increase of ASAT (289.53 +/- 74.07 vs 278.28 +/- 56.22) and ALAT (57.50 +/- 13.07 vs 52.00 +/- 6.08) was noted after 20 days of iron restriction. ASAT and ALAT were 114% and 111% of control values.

The cell proliferation parameters (mitotic index) did not differ between groups (5.1 +/- 0.1 vs 5.3 +/- 0.2 in the experimental group). In the experimental group, the mean length of the villi increased up to 623 +/- 41.2  $\mu\text{m}$  in comparison to control group (437 +/- 36.7  $\mu\text{m}$ ).

Chickens fed a high iron diet had blue Perls'-positive material within a subapical vesicular compartment of enterocytes, which may represent recycling endosomes. At the same time, enterocytes showed a preferred apical distribution of TRPV1, as demonstrated by immunohistochemistry (Fig.2).

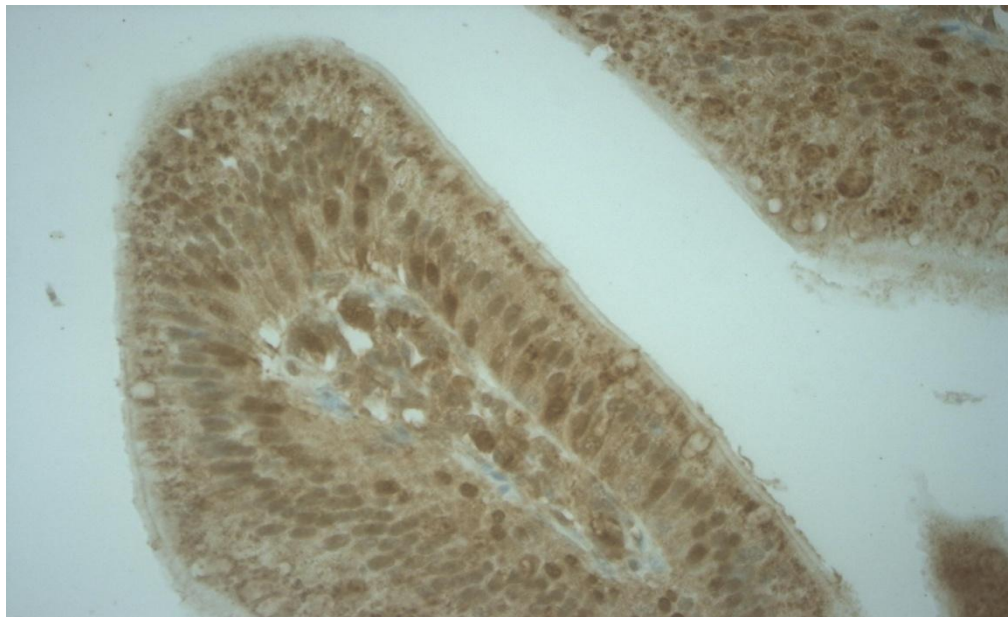


Figure 2. **Positive apical vesicle TRPV1 immunohistochemical staining (arrows)**

In enterocytes, the polarized distribution of membrane enzymes, channels and transport proteins provide the basis for the vectorial transport functions of the epithelium. Intestinal iron absorption involves proteins located in the brush border membrane, cytoplasm, and basolateral membrane of duodenal enterocytes. The apical divalent metal transporter-1 transports ferrous iron from the lumen into the cells, while the basolateral transporter ferroportin extrudes iron from the enterocytes into the circulation. Once inside the enterocyte, there are two fates for iron: it may leave the cell or it can be bound to ferritin. We hypothesized, that the third homeostatic mechanism may include the uptake of iron into the apical vesicles. This conclusion is consistent with the some of our early investigations directed at clarifying the role of subapical vesicles in the regulation of zinc homeostasis (6). It appears reasonable to attribute the observed expression of TRPV1 on the apical vesicles to this phenomenon. Cellular iron homeostasis must be balanced to supply enough iron for metabolism and to avoid excessive, toxic levels. To perform intracellular compartmentalization, iron can cross a vesicle membrane with the aid of TRPV1. There would be a high probability that TRPV1 is not specific to calcium, and can transport other metal ions. Moreover, at higher iron concentrations other mechanisms (perhaps associated with the vesicular transport of iron) may come into play (4).

As iron metabolism principally takes place in liver, intestines and blood, we studied the interference of iron deficient anemia in the morphofunctional changes of these organs and tissues. Intriguingly, iron deficiency results in accumulation of iron in the liver. We do not yet understand how this occurs, but we envision two possibilities. First of all, the induction of transferrin receptors might be one of the mechanisms of iron deposition in hepatocytes (9, 12). In the second place it may be that phagocytosis of damaged erythrocytes is closely related to the storage of iron derived from hemoglobin. Most of the iron in the organism is recycled when old erythrocytes are taken out of circulation and destroyed with their iron scavenged by macrophages, and returned to the storage pool for re-use. It is well established that peroxidative damage results in significant reduction in erythrocyte lifespan in iron deficiency (3). Present study showed

that iron deposition in the liver occurs primarily in Kupffer cells and then “spills over” into hepatocytes to a lesser degree.

Both inadequate and excessive iron cause significant mitochondrial malfunction (13). In our previous studies we have also demonstrated that mitochondria are target organelles for iron (5). Therefore, alterations of the most reliable markers of hepatocellular injury (ALAT and ASAT) seemed to have been due more to iron induced damage of hepatocyte mitochondria and subsequent cell death in hepatocytes.

After 20 days of iron deficiency a duodenum mucosal hyperplasia was observed. The increase of villus height in iron-deficient rats is most probably due to the decreased rate of cell death among mature enterocytes. We are of the opinion that these changes reflect an attempt to increase iron absorption to counteract iron deficiency. Serum iron concentration decreased approximately 35 times in iron – deficient rats compared to controls. It can be concluded that serum iron value is a sensitive indicator of possible iron deficiency anemia. A short – term moderate iron deficiency with ranging hemoglobin from 17.71 to 10.1, was accompanied by a decrease of erythrocyte count. The results obtained in this study indicate the occurrence of hypochromic anemia in experimental animals.

We consider that our results offer a valuable tool for investigating nutritional disorders and for screening pharmaceutical compositions for improving iron absorption. Our observations also provide a basis for elucidation of the physiological role of TRPV1 in iron homeostasis.

## REFERENCES

1. Guha, D., Walia, B., Tandon, B., Deo, M., Ghai, O. Small bowel changes in iron-deficiency anemia of childhood. *Archives of Diseases in Childhood*. 1968; 43: 239-244.
2. Gunthorpe, M., Szallasi, A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14: 32-41.
3. Jain, S., Yip, R., Hoesh, R., Pramanok, A., Dallman, P., Shohet, S. Evidence of peroxidative damage to the erythrocyte membrane in iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 37: 26-30.
4. Linder, M., Moriya, M., Whon, A., Kassa, A., Gilley, C. Vesicular transport of Fe and interaction with other metal ions in polarized Caco2 cell monolayers. *Biol. Res.* 2006; 39: 143-156.
5. Markovs, J., Rozentale, B., Viksna, L. Histochemical and ultrastructural study of iron-loaded liver cells in rodents and men. *Latvijas Universitātes raksti*. 2004; 668: 135-139.
6. Markov, Y., Berzin, N., Valdman, A. Morphological analysis of zinc-accumulation capacity in organs of digestive system. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1992; 3: 324-327.
7. McCall, M., Newman, G., O'Brien, J., Witts, L. Studies in iron metabolism. *Brit. J. Nutr.* 1962; 16: 305 – 323.
8. Morais, M., Lifschitz, C. Intestinal permeability to lactulose and mannitol in growing rats with iron-deficiency anemia. *Biol. Trace. Elem. Res.* 2004; 99: 233-240.
9. Muller-Eberhard, U., Liem, H., Grasso, J., Giffhorn-Katz, DeFalco, M., Katz, N. Increase in surface expression of transferrin receptors on cultured hepatocytes of adult rats in response to iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 14753-14756.

10. Naiman, J., Oski, F., Diamond, L., Vawter, G., Shwarchman, H. The gastrointestinal effects of iron deficiency anemia. *Pediatrics*. 1984; 33: 83-99.
11. Shan, A. Iron deficiency anemia. *Indian J. Med. Sci.* 2004; 58: 79-81.
12. Tong, X., Kawabata, H., Koeffler, H. Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br. J. Hematol.* 2002; 116: 458-464.
13. Walter, P., Knutson, M., Paler-Martinez, A., Lee, S., Viteri, F., Ames, B. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *PNAS*. 2002; 99: 2264-2269.
14. Wayhs, M., Patricio, F., Amancio, O., Pedroso, M., Fagundes, U., Morais, M. Morphological and functional alterations of the intestine of rats with iron-deficiency anemia. *Br. J. Med. Biol.* 2004; 37: 1631-1635.

# PĀRTIKAS TOKSIKOINFEKCIJAS IEROSINOŠĀS MIKROFLORAS SASTOPAMĪBA GOVS PIENA IEGUVES UN PIRMĀPSTRĀDES PROCESĀ

## INCIDENCE OF FOODBORN TOXICOINFECTIONS SUGGESTIVE MICROFLORA IN MILKING AND FIRST STAGE TREATMENT PROCESSES

**Ināra Helēna Konošonoka, Aleksandrs Jemeljanovs, Daina Ikauniece, Gundega Kleina**

LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvija  
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”, Latvia  
[sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

### ABSTRACT

Bacterial food poisoning is defined as an illness caused by the consumption of food contaminated with bacteria or bacterial toxins. From dairy farm environment some food born pathogens gain entrance in raw milk. The presence of food born pathogens from *Salmonella* genus, spore forming *Bacillus cereus* and gram-negative *Aeromonas hydrophila* were investigated in the dairy farms environment – feed, manure and water. *Salmonella spp.* was detected only in manure samples. 24.6% of all feed samples were contaminated with vegetative cells, but 18.5% with spores of food born pathogen *Bacillus cereus*. Water used in dairy farms was contaminated with enterotoxins produced bacteria *Proteus vulgaris* (53.3%), *Aeromonas hydrophila* (33.3%) and *Bacillus cereus* (26.7%).

**KEY WORDS:** foodborn toxicoinfections, pathogens, dairy farm environment.

### IEVADS

Pārtikas izraisītās akūtās zarnu infekcijas t.sk. toksikoinfekcijas ir nopietna sabiedrības veselības problēma. Toksikoinfekcijas aizvien vēl ir bieži sastopamas visā pasaulē, katru gadu no tām mirst 1.8 miljoni bērnu (Foodborn Disease Outbreaks). 2009. gada 11 mēnešos (janvāris-novembris) Latvijas infektoloģijas centra stacionārā diagnosticēti 39 uztura toksikoinfekciju gadījumi. Salmoneloze konstatēta 86 gadījumos. 367 gadījumos pacientiem bijusi caureja un gastroenterīts, kuru ierosinātājs nav identificēts, līdz ar to daudzos gadījumos slimības ierosinātājs varēja būt ar mikroorganismiem izdalīts toksīns (Stacionāra darba statistiskie rādītāji). Vairāki autori sniedz atšķirīgas toksikoinfekciju definīcijas. Tā, I.Mazjānis un E.Tirāns (2006) uzskata, ka toksikoinfekcijas ir slimību grupa, kas rodas pēc tādu uzturlīdzekļu lietošanas, kuros mikroorganismu darbības rezultātā ir uzkrājušies entero-, neuro- u.c. toksīni. Veselības enciklopēdijā (2009) toksikoinfekcijas definētas kā akūtas slimības, kas rodas, ja uzturā lieto pārtikas produktus, kuros savairojušies noteikti mikroorganismi un/ vai uzkrājušies to izdalītie toksīni. Kā visbiežāk toksikoinfekcijas izraisošie minēti nosacīti patogēni dabā plaši izplatīti mikroorganismi – *Salmonella enteritidis* u.c. *Salmonella* ģints sugas, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Shigella*(*S.*) *dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnaei*. A. Brila (2009) pārtikas



toksikoinfekcijas un intoksikācijas iedala slimību grupā, kuras izraisa nosacīti patogēnie mikroorganismi ar pieaugošu patogenitāti, minot *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Erlhia*, *Bacillus*, *Staphylococcus* u.c. ģinšu pārstāvjus.

Piena fermu vide – kūtsmēsli, pakaiši, barības līdzekļi, fermās lietojamais ūdens, govju ķermenis - apmatojums, tesmeņa un pupu āda, pupu slēdzējmuskuļa mikroflora, tesmeņa vai dzemdes iekaisuma sekrēts, slaukšanas iekārtu caurules, piena dzesēšanas un uzglabāšanas tvertnes ir iespējamie toksikoinfekcijas ierosinošo mikroorganismu avoti, no kuriem tie var kontaminēt izslaukto pienu un saglabāties piena produktos, tā apdraudot produktu patērētāju veselību.

Darba mērķis bija noskaidrot toksikoinfekciju ierosinātāju *Salmonella* ģints baktēriju, *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) u.c. nosacīti patogēnu toksīnus producējošu baktēriju sastopamību slaucamo govju fermu vidē.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Kopumā 2008. - 2009. gadā analizēti 175 dzīvnieku barības, fermās lietojamā ūdens un kūtsmēsļu paraugi. Paraugi ņemti četrās saimniecībās: bioloģiskā saimniecībā „Grantskalni”, Pārgaujas novadā, konvencionālajās saimniecībās SIA „Lāčplēša piens”, Lielvārdes novadā, zemnieku saimniecībā „Robežnieki” Salacgrīvas novadā un SIA „Palsa” Smiltenes novadā.

Paraugu bakterioloģiskie izmeklējumi veikti Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta „Sigra” Latvijas Nacionālā akreditācijas biroja akreditētajā Bioķīmijas un mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā (LATAK-T-038-07-99-A). *Salmonella* ģints baktērijas izolētas saskaņā ar standarta LVS EN ISO 6579:2003 metodiku; *B. cereus* identificēts saskaņā ar standarta LVS EN ISO 7932:2005 metodiku; *S. aureus* izolēts saskaņā ar standarta LVS EN ISO 6888-1:1999/A1:2003 metodiku; nosacīti patogēnās *A. hydrophila* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas tika izolētas, izmantojot kompleksās un selektīvās barotnes: gaļas peptona agaru ar 5% asins piedevu, MacConkey agaru (Biolife, Spānija), RapidEcoli (Biorad, UK) u.c.

Veikta iegūto datu statistiskā apstrāde, izmantojot SPSS 15.0 programmu.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Toksikoinfekciju ierosinātājas baktērijas no *Salmonella* ģints netika konstatētas dzīvnieku barības paraugos (n = 130). *Salmonella enteritidis* konstatējām vienā no pieciem pārbaudītajiem mēsļu paraugiem, līdz ar to mēsli uzskatāmi par vienu no salmonellu avotiem pienā.

Lai gan pārtikas saindēšanos ierosina atsevišķi *B. cereus* celmi, bet citi šīs baktērijas celmi var būt probiotiķi dzīvniekiem, galvenokārt cāļiem, cūkām un trušiem (Ryan, Ray, 2004), tomēr jāņem vērā, ka *B. cereus* producē vemšanu izraisošu toksīnu cereulīdu, kā arī citus piecu veidu toksīnus, līdz ar to ir cilvēku pārtikas toksikožu ierosinātājs. Pēdējos gados pasaulē bijuši 27 000 *B. cereus* ierosināti cilvēku saslimšanas gadījumi (Christiansson et al., 1998; Elnaga et al., 2002). Tā kā *B. cereus* veido sporas, kas iztur augstas temperatūras, tad nereti šo toksikoinfekciju ierosinātāju atklāj sausajā pienā (Snydman, Gorbach, 1991), kur tas nokļūst no fermu vides piena ieguves un pirmapstrādes procesa laikā.

Daļa zinātnieku uzskata, ka dzīvnieku barība ir galvenais faktors *B. cereus* nokļūšanai pienā (Crielly et al., 1994), bet citi norāda, ka dzīvnieku barība ir nozīmīgs faktors piena kontaminēšanai ar *B. cereus* sporām no fekālijām tikai tad, ja sporu skaits ir virs 100 000 vienā gramā fekāliju (Magnusson et al., 2007). Mūsu pētījumā *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 24.6 %, bet sporas – 18.5 % no visiem analizētajiem

barības paraugiem (n = 130). Vērtējot *B. cereus* sastopamību katrā atsevišķā barības līdzekļu grupā (1.tabula), jāsecina, ka tikai 2 zāles paraugi (n = 14) saturēja šīs baktērijas veģetatīvās šūnas, bet sporas zālē netika konstatētas. Savukārt skābbarības (n = 48) un skābsiena (n = 16) paraugi 25.0% gadījumu bija kontaminēti ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām, bet 12.5% gadījumu ar sporām. *B. cereus* veģetatīvo šūnu un sporu klātbūtne skābbarībā liecina par kļūdainu skābbarības sagatavošanas procesu, t.i., nepilnīgu skābbarības noblīvēšanu un skābbarības tvertnes noseģšanu, kā rezultātā gaiss pieklūst skābējamajai masai un ļauj attīstīties, veidot sporas un toksīnus aerobajām *B. cereus* baktērijām.

Sienā (n = 10) *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 20.0% gadījumu, bet sporas netika konstatētas nevienā paraugā. Savukārt visi salmu paraugi (n = 6) bija kontaminēti ar *B. cereus* sporām (1. tabula).

1. tabula / Table 1

***B.cereus* veģetatīvo šūnu un sporu izolēšanas biežums dažādos barības līdzekļos  
Incidence of *B.cereus* vegetative cells and spores in different feedstuffs**

Barības līdzekļi Feedstuffs	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas Vegetative cells n, (%)	<i>B. cereus</i> sporas Spores n, (%)
Zāle/ Green grass (n = 14)	2 (14.3)	Nav
Skābbarība/ Silage (n = 48)	12 (25.0)	6 (12.5)
Skābsiens/ Haylage (n = 16)	4 (25.0)	2 (12.5)
Siens/ Hay (n = 10)	2(20.0)	Nav
Spēkbarība/ Fodder (n = 32)	10 (31.3)	10 (31.3)
Saimniecībā gatavots barības maisījums/ Self prepared feed concentrate (n = 4)	2 (50.0)	Nav
Salmi/ Straw (n = 6)	2 (33.3)	6 (100.0)

Tā kā salmi tika izmantoti kūtīs kā pakaiši, tad sporas kopā ar putekļiem kontaminē kūts gaisu, sienas, griestus, govju apmatojumu, radot iespēju sporām nokļūt izslauktajā pienā. Zinātnieku pētījumi apliecina, ka vispiesārņotākie ar *B. cereus* ir pakaiši, pie tam *B. cereus* sporu skaits pakaišos pozitīvi korelē ( $r = 0.72$ ) ar sporu skaitu koppienā (Magnusson et.al., 2007). Spēkbarība - dažāda veida graudi, rapša rauši, saulespuķu spraukumi (n = 32) 31.3% gadījumu bija kontaminēti kā ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām, tā sporām. Konvencionālajā saimniecībā gatavotais barības maisījums divos paraugos no četriem bija kontaminēts ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām (1. tabula).

Visbiežāk *B.cereus* veģetatīvās šūnas un sporas konstatējām ziemas periodā lietotajos barības paraugos. Konvencionālajās un bioloģiskajās saimniecībās izolēšanas biežums bija līdzīgs (2. tabula).

Pavasārī *B. cereus* izolēšanas biežums no barības līdzekļiem samazinājās, salīdzinot ar ziemas periodu, abos saimniekošanas veidos. Vasaras periodā vairums analizēto paraugu bija svaiga zāle, tajā *B. cereus* baktērijas konstatējām reti. Iegūtie rezultāti nav pretrunā ar literatūras datiem (Vissers et al., 2007), kur norādīts, ka *B. cereus* sporu pieaugums koppienā vasaras periodā nav saistīts ar govju laišanu ganībās, bet gan ar skābbarības izbarošanu. Rudens periodā, kad dzīvnieku barība ir svaigi sagatavota, kontaminācija ar *B. cereus* bija neliela (2.tabula).

***B. cereus* veģetatīvo šūnu un sporu izolēšanas biežums barības līdzekļos atkarībā no saimniekošanas sistēmas un gadalaika**  
**Incidence of *B. cereus* vegetative cells and spores depending of management form and season**

Sezona/ paraugu skaits Season/number of samples	Bioloģiskā saimniekošana Organic farming		Konvencionālā saimniekošana Conventional farming	
	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas/ vegetative cells, %	<i>B. cereus</i> sporas/ Spores, %	<i>B. cereus</i> veģetatīvās šūnas/ vegetative cells, %	<i>B. cereus</i> sporas/ Spores, %
Ziema/ Winter n=48	44.4	44.4	53.3	40.0
Pavasaris/ Spring n=28	27.1	14.3	33.4	15.4
Vasara/ Summer n=20	0.0	0.0	0.0	0.0
Rudens/ Autumn n=34	9.5	14.0	17.6	5.9

Piena fermās ūdens tiek izmantots gan govs tesmeņa apmazgāšanai, gan piena trauku, piena vadu, slaukšanas stobriņu un dzesēšanas tvertņu mazgāšanai. Tādējādi netīrs, ar mikroorganismiem kontaminēts ūdens viegli var piesārņot pienu. Pārbaudot 30 piena fermu ūdensvadu un 10 piena sistēmas skalošanas ūdeņu paraugus, konstatēti vairāki toksikoinfekcijas ierosinoši mikroorganismi (3.tabula).

**No ūdens paraugiem izolētā mikroflora un mikroorganismu izolēšanas biežums**  
**Spectrum of microflora and incidence of microorganisms' isolated from water samples**

Izolētais mikroorganisms Isolated microorganisms	Paraugšs Sample	
	Piena fermas ūdensvada ūdens Water from water pipe, n = 30; n(%)	Piena dzesēšanas tvertnes skalojamais ūdens Milk cooling tank rinsing water, n = 10; n (%)
<i>Proteus vulgaris</i>	16 (53.3)	10 (100.0)
<i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	16 (53.3)	10 (100.0)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10 (33.3)	6 (60.0)
<i>Pantoea agglomerans</i>	10 (33.3)	2 (20.0)
<i>B. cereus</i>	8 (26.7)	6 (60.0)
<i>Clostridium spp.</i>	6 (20.0)	4 (40.0)
<i>Leuconostoc citreum</i>	6 (20.0)	6 (60.0)
<i>E. coli</i>	4 (13.4)	4 (40.0)
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	4 (13.3)	6 (60.0)
<i>Aeromonas cavia</i>	2 (6.7)	0

*Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*) satur daudzus virulences faktoros – flagellas, ārējos membrānu proteīnus, lipopolisaharīdus, kapsulu polisaharīdus u.c., t.sk. endotoksīnus (Rozalski et al., 1997). Tādējādi šis mikroorganisms pieskaitāms pie toksikoinfekciju ierosinātājiem. *P. vulgaris* konstatējām 53.3% ūdensvada un visos piena dzesēšanas tvertnes skalojamā ūdens paraugos. *Enterococcus* ģints pārstāvji ir indikatororganismi ūdens piesārņošanai ar fekālijām, līdz ar to fekālijās esošiem patogēniem t.sk. toksikoinfekciju ierosinātājiem no *Salmonella* ģints. *Enterococcus* spp. piesārņojumu uzrādīja 53.3% ūdensvada un 100.0% piena tvertņu skalojamā ūdens paraugi. Ūdens paraugos tika konstatētas divas *Aeromonas* ģints sugas *Aeromonas cavia* un *A. hydrophila*. No sešām *Aeromonas* ģintī esošajām sugām, *A. hydrophila* ir nosacīti patogēna, īpaši izturīga ārējā vidē, aug gan aerobos, gan anaerobos apstākļos, vairojas ledusskapja temperatūrās, ir rezistentā pret dezinfekcijas līdzekļiem. Pateicoties *A. hydrophila* struktūrai, tā ir toksiska dzīvājiem organismiem. Nokļūstot cilvēka vai dzīvnieka organismā, šīs baktērijas kopā ar asins straumi ceļo uz kādu no orgāniem, producējot aerolizīna citotoksisko enterotoksīnu (ACT), kurš bojā organisma audus (Bad Bug Book, 1991). 33.3% ūdensvada ūdens un 60.0% piena tvertņu skalojamā ūdens paraugu konstatētas šīs nevēlamās baktērijas, kas brīvi var kontaminēt izslaukto pienu. Sporas veidojošās baktērijas *B. cereus* saturēja 8 (26.7%) ūdensvada un 6 (60.0%) skalošanas ūdeņu paraugi.

Jāsecina, ka ūdens slaucamo govju fermās ir piesārņots ar mikroorganismiem, t.sk. toksikoinfekciju ierosinātājiem. Ņemot ūdens paraugus fermās, novērots, ka bieži ūdensvada krānam pievienota gumijas caurule, kas izskaidro ievērojamo mikrobiālo piesārņojumu ūdenī. Gumijas caurules un krāna savienojuma vietās, kā arī caurules galā, kas nereti guļ uz grīdas, iespējama mikroorganismu uzkrāšanās un vairošanās, veidojot bioplēves uz šī organiskā materiāla. Šādi mikroorganismi kopā ar ūdeni nonāk slaukšanas sistēmas vados un piena tvertnē, tos mazgājot un skalojot.

Pētījuma rezultāti apliecina, ka slaucamo govju fermu vide – dzīvnieku barība, mēsli un fermās lietojamais ūdens – ir potenciāli toksikoinfekciju ierosinātāju mikroorganismu avoti. Neievērojot sanitāri higiēniskos noteikumus piena ieguves un pirmapstrādes procesu laikā, nevēlamie mikroorganismi var piesārņot iegūto pienu un saglabāties tā pārstrādes produktos.

## SECINĀJUMI

1. *Salmonella* ģints baktērijas netika konstatētas dzīvnieku barības paraugos. *Salmonella enteritidis* konstatētas vienā no pieciem kūtsmēslu paraugiem. *Salmonella* ģints baktērijas netika konstatētas ne bioloģiskās, ne konvencionālo saimniecību piena paraugos.
2. Dzīvnieku barība ir riska faktors piena piesārņošanai ar toksikoinfekciju ierosinātāju *B. cereus*. *B. cereus* veģetatīvās šūnas konstatētas 24.6%, bet sporas – 18.5% visu barības paraugu. Skābbarības un skābsiena paraugi 25.0% gadījumos bija kontaminēti ar *B. cereus* veģetatīvajām šūnām. Vispiesārņotākie ar *B. cereus* sporām bija salmu paraugi.
3. Piena fermu ūdensvada ūdens ir piesārņots ar toksikoinfekciju ierosinātājiem mikroorganismiem: *P. vulgaris* konstatēts 53.3%, *A. hydrophila* – 33.3% un *B. cereus* – 26.7% ūdens paraugu. Piena dzesēšanas tvertnes skalošanas ūdenī minēto mikroorganismu izolēšanas biežums pieaug, atbilstoši, 100.0%, 60.0% un 60.0%.

## LITERATŪRA

1. Bad Bug Book (1991) Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. "[Aeromonas hydrophila.](#)" [Elektroniskais resurss]. – Tiešsaistes pakalpojums. – Pieejas veids: tīmeklis <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/appl-Resurss> aprakstīts 2010.30.04.
2. Brila, A. Infekcijas slimību epidemioloģija.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2009; 198. ISBN 978-9984-26-409-7.
3. Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A. Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. - Journal of Applied Microbiology. 1994; 77: 256-263.
4. Elnaga, H.I., Hegazi, F.Z., Elnaga, I.G. Spore-forming rods surviving boiling the raw milk and implicated in later spoilage of the product // Archiv fur Lebensmittelhygiene 2002; Vol.53, no 4: 86-89.
5. Foodborn Disease Outbreaks: Guidelines for Investigations and Control. World Health Organization, 200; 146. ISBN 978-92-4-1547222.
6. Konošonoka, I. H., Jemeljanovs, A., Blūzmanis, J. Staphylococcus ģints baktēriju sastopamība veselu govju pienā un slimu govju tesmeņa sekretā. Zinātniskā konferences “Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas kvalitāte” rakstu krājums, Jelgava, Veterinārmedicīnas fakultāte. 2004; 150. – 155.
7. Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B. Bacillus cereus Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk. – Journal of Dairy Science. 2007; 6: 2745-2754.
8. Mazjānis, I., Tirāns, E. Infekcijas slimības // Mikrobu ierosinātās saindēšanās ar uzturlīdzekļiem –Rīga, 2006; 501-515. ISBN 9984-9236-5-7.
9. Ryan, KJ; Ray, CG. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. 2004; 979.
10. Rozalski,A., Sidorczyk, Z., Kotelko, K. Potential virulences factors of Proteus bacilli. – Microbial Mol Biol Rev.. 1997; 61 (1): 65-89.
11. Snyderman, D.R., Gorbach, S.L. Bacterial food poisoning // Bacterial infections of humans. Epidemiology and control. USA, 1991; 87-113.
12. Stacionāra darba statistiskie rādītāji (pacientu skaits diagnožu grupās). 2009.gada janvāris- novembris. Latvijas infektoloģijas centrs. [Elektroniskais resurss]. – Tiešsaistes pakalpojums. – Pieejas veids: tīmeklis <http://www.lic.gov.lv/docs/268/2009-dok/Stac-atsk.pdf>
13. Veselības enciklopēdija. Uztura toksikoinfekcijas.- Rīga: Nacionālais apgāds, 2009; 649-650.
14. Vissers, M.M.M., Te Giffel, M.C., Driehuis, F., De Jong, P., Lankveld, J.M.G. Minimizing the Level of Bacillus cereus Spores in Farm Tank Milk. – Journal of Dairy Science. 2007; 90,7: 3286-3293.

# STRAUSA GAĻAS KVALITĀTE „*SOUS VIDE*” IEPAKOJUMĀ

## THE QUALITY OF PACKED OSTRICH MEAT IN „*SOUS VIDE*”

Janīna Kīvīte, Daina Kārkliņa, Iriša Mūrniece

LLU, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Food Technology, Latvia

[daina.karklina@llu.lv](mailto:daina.karklina@llu.lv)

### ABSTRACT

Fresh ostrich meat was marinated and prepared by „Sous vide” technology and stored 28 days at  $+4\pm 1$  °C. Prepared meat samples were evaluated on changes in typical meat quality characteristics: pH, bacterial counts and vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>. Obtained results showed that „Sous vide” technology was effective in protecting the ostrich meat from microbiological contamination. Minimal changes were observed in pH and in the content of vitamins B.

**KEY WORDS:** ostrich meat, „Sous vide”, quality.

### IEVADS

Problēmas, kas radās liellopu gaļas tirgū saistībā ar spongiformo encefalopātiju (BSE), bija viens no galvenajiem iemesliem strausa gaļas pieprasījuma kāpumam. Strausu audzēšana strauji ienāca mūsu lauksaimniecībā un ekonomikā un šodien ir likti pamati strausu gaļas putnu audzēšanai un šķirnes izkopšanai Latvijā.

Strausa gaļa ir aprakstīta kā veselīga alternatīva citiem gaļas produktiem. Strausa gaļa ir veselīga, jo tai ir zems tauku un holesterīna līmenis, salīdzinoši augsts polinepiesātināto taukskābju līmenis attiecībā pret liellopu un vistas gaļu. Piesātināto taukskābju koeficients pret mono un polinepiesātinātajām taukskābēm strausa gaļā ir 1: 1, kas no diētiskā viedokļa ir ļoti labi. Vizuāli un strukturāli strausa gaļa ir ļoti līdzīga liellopa gaļai. Ar savām garšas un smaržas īpašībām strausa gaļa tiek vērtēta augstāk par liellopa gaļas fileju (Sales et al., 1996).

Latvijā ir pieauguši strausa gaļas un pārstrādes produktu realizācijas apjomi. Interesi par strausa gaļu jau izrādījuši lielveikali „mc<sup>2</sup>”, „Rimi” un „Sky”, kuriem piedāvā no strausa gaļas gatavotu salami, auksti kūpinātu un vārīta strausa gaļas desu, karsti kūpinātu strausa fileju un strausa gaļas pastētes konservus.

Visdrošākā iespēja nogaršot strausa gaļu pagaidām ir saimniecībās, kas nodarbojas ar lauku tūrismu, taču strausa gaļu iecienījuši arī Latvijas restorāni. Steiks un fileja ir visplašāk izmantotie gaļas gabali. Filejas trijstūri, kas atrodas putna krūšu priekšdaļā var izmantot cepešu pagatavošanai. Kakls, aknas, sirds un mazie griezumi tiek izmantoti galvenokārt aukstās gaļas, pastēšu un maltās gaļas izstrādājumu gatavošanai.

Lai palielinātu strausa gaļas izstrādājumus pieejamību tirdzniecības tīklos un sabiedriskās ēdināšanas sektorā, viena no nopietnākajām problēmām ir sagatavot gaļas izstrādājumus ar pagarinātu uzglabāšanas laiku. Strausu gaļas uzglabāšanas laiks ir atkarīgs no sākotnējā baktērijas daudzuma gaļā, uzglabāšanas temperatūras, kā arī no apkārtējā vidē esošā skābekļa daudzuma, kas veicina gaļā oksidācijas procesus. Tāpēc strausu gaļas sagatavošanai sabiedriskās ēdināšanas sektorā un tirdzniecības tīklos būtu jāizvēlas tāda tehnoloģija, kas varētu kontrolēt šos faktorus un kļūtu par atslēgu uzglabāšanas laika pagarināšanai. „Sous vide” ir tehnoloģija, kas piedāvā iepriekš sagatavotu produktu iepakot vakuumā, to termiski apstrādāt un tūlīt atdzesēt, tādējādi kavējot aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu attīstību un tauku oksidāciju

uzglabāšanas laikā un ļauj iegūt produktu ar uzlabotu sensoro kvalitāti un ilgāku uzglabāšanas laiku. „*Sous vide*” sagatavotais produkts pēc īsas siltumapstrādes ir lietojams tūlīt patēriņam (Insani, 2002). Tāpēc pētījuma mērķis bija noteikt Latvijā audzēto, ar „*Sous vide*” tehnoloģiju gatavoto strausu gaļas kvalitāti.

## MATERIĀLS UN METODIKA

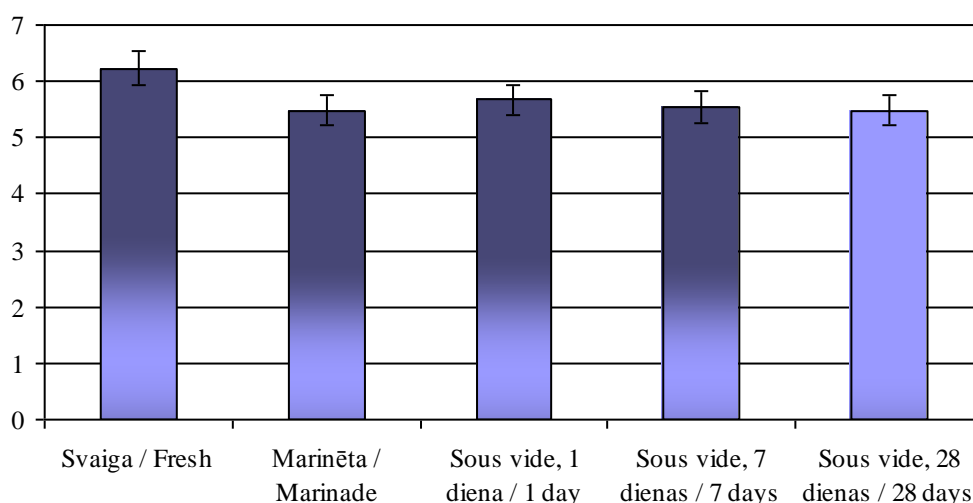
Pētījumu veikšanai izmantota strausa gaļa, kas iepirkta Latvijā strausu audzētāju fermā „Ozoliņi AB”. Svaigai strausa gaļai veica pirmapstrādi un gaļas paraugus sagrieza pa 250 g. Sensoro īpašību uzlabošanai gaļu marinēja izturot 12 stundas  $+6\pm 1$  °C temperatūrā. Gaļas paraugus pēc marinēšanas nosusināja ar papīra dvieli, nosvēra un iepakojā vakuumā plēves maisiņos ar biežumu 60  $\mu\text{m}$  lietojot iepakojšanas iekārtu „Multivac”. Iepakotos paraugus pastērizēja  $+90$  °C temperatūrā 40 min, karsēšanai izmantojot vannu „Clifton food range”. Paraugus pēc atdzesēšanas uzglabāja aukstumvitrinā „Elcold”  $+4\pm 1$  °C temperatūrā 28 dienas.

Svaigai, marinētai un termiski apstrādātai strausa gaļai, pēc tās sagatavošanas un uzglabāšanas laikā (7.diena, 28.diena) noteica pH, mikroorganismu skaita un B grupas vitamīnu – tiamīna (turpmāk tekstā B<sub>1</sub>), riboflavīna (B<sub>2</sub>) un kobalamīna (B<sub>12</sub>) satūra izmaiņas.

Datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm, iegūtajiem rezultātiem aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība un standartnovirze.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJAS

pH skaitliskajai vērtībai gaļā ir būtiska nozīme, gaļu uzglabājot un novērtējot gan no veterināri sanitārā, gan arī tehnoloģiskā viedokļa. Jo zemāka pH skaitliskā vērtība gaļā, jo gaļa ir izturīgāka pret mikroorganismu iedarbību. Paaugstināts gaļas pH ir labvēlīga vide mikroorganismu attīstībai un veicina straujāku gaļas bojāšanos. Svaigiem, marinētiem, ar „*Sous vide*” tehnoloģiju termiski apstrādātiem un uzglabātiem strausa gaļas paraugiem tika noteiktas pH izmaiņas. Svaigas strausu gaļas pH parasti ir robežās 5.00 – 6.00 un var svārstīties atkarībā no muskuļa grupas no 5.84 līdz 6.13. Kā rāda pētījuma rezultāti, analizētās svaigās strausu gaļas pH ir  $6.23 \pm 0.31$ . Pēc marinēšanas marinētās strausu gaļas pH ir zemāks un tā skaitliskā vērtība ir  $5.48 \pm 0.27$ . pH vērtības izmaiņas gaļā ir saistītas ar marinādē esošo etiķskābi, kas paaugstina pH vērtību. Termiski apstrādājot strausu gaļu ar „*Sous vide*” tehnoloģiju un pēc tam paraugus uzglabājot, nozīmīgas pH svārstības netika konstatētas (1. attēls).



1. attēls. pH izmaiņas ar „*Sous vide*” tehnoloģiju sagatavotajos strausu gaļas paraugos

Figure 1. Changes of pH in ostrich meat samples prepared by „*Sous vide*”

Gaļa ir ideāla vide mikroorganismu attīstībai, tādēļ to uzskata par ātri bojājošos produktu. Lai nenotiktu gaļas bojāšanās un pagarinātu tās uzglabāšanas laiku, ir nepieciešama piemērota vide tās uzglabāšanai. Gaļas uzglabāšanas laikā zemās temperatūrās bojāšanās mikroflorā dominē psihrotrofās, gramnegatīvas nūjiņveida baktērijas. Ja gaļa ir iepakota vakuumā un tā uzglabāta zemā temperatūrā, bojāšanās procesos aerobās baktērijas nomaina anaerobi mikroorganismi - *Lactobacillus* un *Carnobacterium* veidi.

Sākotnējais mikroorganismu skaits ir viens no kritiskajiem faktoriem, kas ietekmē gaļas derīguma termiņu. Analizējot svaigas strausu gaļas mikrofloru, mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu skaits ir normas robežās, kas strausa gaļas paraugos samazinās pēc marinēšanas un termiskās apstrādes. Arī uzglabāšanas laikā nozīmīga mikroorganismu skaita palielināšanās nav konstatēta (1. tabula). Mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu skaits „*Sous vide*” sagatavotajos strausa gaļas produktos atbilst mikrobioloģiski nekaitīgam gaļas produktam.

1.tabula / Table 1

**Mikroorganismu skaits svaigos, marinētos un ar „*Sous vide*” tehnoloģiju sagatavotos un uzglabātos strausa gaļas paraugos**  
**Microbiological loads in fresh ostrich meat , marinated and stored ostrich meat samples prepared by „*Sous vide*”**

Mikroorganismu skaits, kvv.g <sup>-1</sup> / Bacteria count, cfu./g <sup>-1</sup>	Svaiga / Fresh	Marinēta / Marinated	„ <i>Sous vide</i> ” 1 diena / 1 day	„ <i>Sous vide</i> ” 7 dienas / 7 days	„ <i>Sous vide</i> ” 28 dienas / 28 days
MAFAM / Total aerobic and facultative anaerobic	9.9×10 <sup>4</sup>	5.3×10 <sup>3</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	2.1×10 <sup>2</sup> ±78	<1×10 <sup>1</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i> skaits / count	3.7×10 <sup>2</sup>	8.2×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	<1×10 <sup>1</sup>	<1×10 <sup>1</sup>
Koliformas / Coliforms	1.9×10 <sup>2</sup>	< 4×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	<1×10 <sup>1</sup>	<1×10 <sup>1</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	1×10 <sup>1</sup>	<1×10 <sup>1</sup>
Pienskābes baktērijas / Lactic acid bacteria	3.7×10 <sup>3</sup>	8.6×10 <sup>2</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	<4×10 <sup>1</sup>	<4×10 <sup>1</sup>
Sulfitreducējošās klostrīdijas / Sulphite-reducing clostridia	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>	< 1×10 <sup>1</sup>

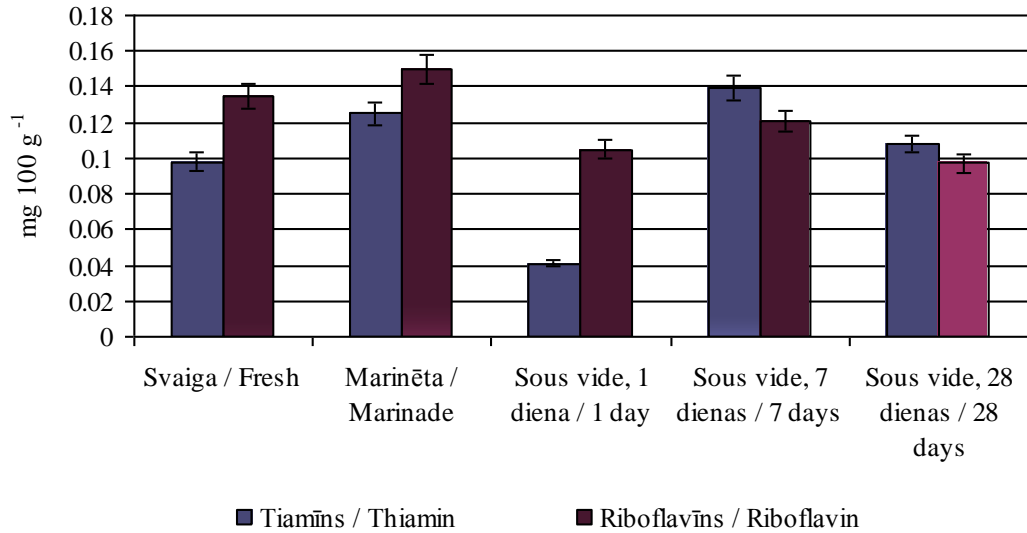
Uzglabāšanas laikā vakuumā strausa gaļas paraugos nedaudz palielinājās pienskābes baktēriju skaits, kā rezultātā nedaudz uzglabāšanas laikā mainās pH. *Enterobacteriaceae*, un koliformu skaits izvēlētajā apstrādes režīmā ir ievērojami samazinājies salīdzinot ar svaigu gaļu. *L.monocytogenes* un sulfitreducējošo klostrīdiju klātbūtne netika konstatēta.

Svaigas gaļas sastāvā ir atrodami ūdenī šķīstošie vitamīni - B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>. Termiskās apstrādes rezultātā vitamīnu daudzums gaļā samazinājās.

Pēc iegūtajiem rezultātiem B<sub>1</sub> vitamīna saturs palielinās gaļu marinējot, bet samazinās to termiski apstrādājot. Pēc 28 dienu uzglabāšanas laika to saturs nedaudz paaugstinās (2. attēls). Arī B<sub>2</sub> vitamīna saturs nedaudz palielinājās uzglabāšanas laikā. To varētu skaidrot ar daļēju sulas uzsūkšanos atpakaļ gaļā.

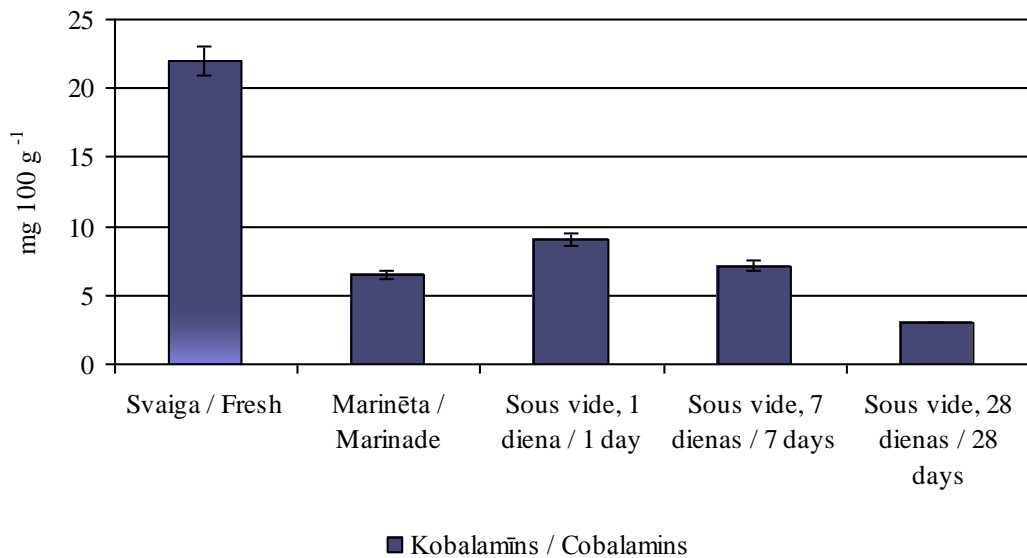


Pēc eksperimenta datiem varam secināt, ka gaļā esošie B<sub>1</sub> un B<sub>2</sub> grupas vitamīnu saturs ir diezgan stabils. Tas saskan arī ar citu zinātnieku veiktajiem pētījumiem (Ginevra Lombardi-Boccia et al., 2005). B<sub>12</sub> satura izmaiņas strausa gaļas paraugos norādītas 3. attēlā.



2. attēls. Tiamīna un riboflavīna (B<sub>1</sub> un B<sub>2</sub>) satura izmaiņas ar „Sous vide” tehnoloģiju sagatavotajos strausa gaļas paraugos

Figure 2. Changes of thiamin and riboflavin (B<sub>1</sub> un B<sub>2</sub>) content in ostrich meat samples prepared by „Sous vide”



3.attēls. Kobalamīna (B<sub>12</sub>) satura izmaiņas ar „Sous vide” tehnoloģiju sagatavotajos strausa gaļas paraugos

Figure 3. Changes of cobalamins (B<sub>12</sub>) content in ostrich meat samples prepared by „Sous vide”

Kobalamīna saturs ir samazinājies paraugos, kas sagatavoti „Sous vide” un zemākais tā saturs ir noteikts strausa gaļas paraugos, kas sagatavoti „Sous vide” un uzglabāti 28 stundas.

## SECINĀJUMI

1. Termiski apstrādājot strausa gaļu ar „Sous vide” tehnoloģiju svaigas gaļas pH pazeminājās no 6.23 līdz 5.67. Paraugus uzglabājot, pH svārstības bija nelielas.
2. MAFA, Enterobacteriaceae, un koliformu skaits izvēlētajā apstrādes režīmā samazinājās salīdzinot ar svaigu gaļu. *L. monocytogenes* un sulfītreducējošo klostrīdiju klātbūtne netika konstatēta. „Sous vide” sagatavotajos strausa gaļas paraugos, uzglabājot tos aukstumvitrīnā “Elcold”  $+4\pm 1$  °C temperatūrā, praktiski nedaudz paaugstinājās pienskābes baktēriju skaits.
3. Strausa gaļas paraugos sagatavojot tos izvēlētajā „Sous vide” režīmā un salīdzinot tos ar svaigas gaļas paraugiem, bioloģiski aktīvo vielu – B1 un B2 grupas vitamīnu zudumi ir nelieli. B12 vitamīna dinamiskā vērojama lielāka diference starp svaigo gaļu un „Sous vide” gatavoto.

## LITERATŪRA

1. Lombardi-Boccia, G., Lanzi, S., Aguzzi, A. Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005; Vol 18, Issue 1: 39-46.
2. Insani, E. M., Picallo, A. B., Gallinger, M. M., et al. „Sous vide” cooked beef muscles: effects of low temperature- long time ( LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 2002; 37: 425- 441.
3. Sales, J., Marals, D., Kruger, M. Fat content, Caloric Value, Cholesterol content, and Fatty acid Composition of Raw and Cooked Ostrich Meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1996;Vol 9, Issue 1: 85-89.

# ENDOMETRIAL HISTOLOGICAL CHANGES AND PREGNANCY RATES IN MARES IMPAIRED CERVICAL DRAINAGE

**Evija Liepina, Vita Antane**

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[evija\\_liepina@inbox.lv](mailto:evija_liepina@inbox.lv)

## ABSTRACT

Patency of the cervix of the mare is considered to be a prerequisite for efficient uterine drainage after mating. Endometriosis, also known as chronic degenerative endometritis, is described as periglandular and/or stromal endometrial fibrosis, including glandular alteration in fibrotic foci. Endometrial fibrosis, a major cause of reduced reproductive efficiency in mares, is a progressive and irreversible condition which tends to worsen with age. The aim of the study is to evaluate biopsy specimens from endometrium obtained during the first and fifth oestrus to determine initial microscopic status of endometrium and any changes in the endometrium that may have happened as a result of occluded cervix and analyze pregnancy rates after the experiment. A total of 24 cycling light breed mares from MTT Agrifood Research and Equine College, Ypaja, Finland, were used in the study. The study was designed as a cross-over study where each mare received two treatments one of which was control treatment thus serving as internal control. The mares were observed during 5 oestrus periods and during two of these periods (second and fourth oestrus) the treatment was applied. According to the closing and opening of the cervix which was regulated using Bivona catheter, mares were distributed in 3 treatments. TRT A -- intrauterine catheter closed for 25 h; TRT B - - intrauterine catheter closed for 6h+19 h (catheter closed for 6h, opened and fluid collected; catheter closed for another 19h); TRT C (control) - no intrauterine catheter. The results show that occlusion of the cervix might influence the pregnancy rates since the uterus could not clear itself from inflammatory cells such as polymorphonuclear leukocytes. The impairment of uterine drainage increased periglandular fibrosis in endometrium and decreased pregnancy rates.

**KEY WORDS:** endometriosis, mare, biopsy, inflammation, fibrosis.

## INTRODUCTION

Patency of the cervix of the mare is considered to be a prerequisite for efficient uterine drainage after mating. If the cervix fails to open adequately, post-breeding endometritis will not resolve within 24 hours, as it should be in normal mares, but fluid, PMNs and cytokines will accumulate in the uterus. Reduced myometrial contractions, poor lymphatic drainage, large and overstretched uterus and cervical incompetence are predisposing factors for persistent mating-induced endometritis.

Endometriosis, also known as chronic degenerative endometritis, is described as periglandular and/or stromal endometrial fibrosis, including glandular alteration in fibrotic foci (Hofman et al., 2003). Endometrial fibrosis, a major cause of reduced reproductive efficiency in mares, is a progressive and irreversible condition which tends to worsen with age. It is aggravated by frequent endometrial challenges such as breeding and infection (Ricketts and Alonso, 1991). The fibrosis reduces the efficacy of uterine defence mechanisms and the uterine capacity for foetal nutrition (Oddsdottir C. et al., 2008). Embryonic and fetal loss from endometria with widespread periglandular

fibrosis has been observed and it has been considered to be the major diagnosable case of this type of reproductive failure. Any injury that causes an inflammatory reaction may induce fibrosis.

Endometrial biopsy is evolving as a useful technique for aiding in the diagnosis and prognosis of the endometrium's ability to carry a foal to term, and it plays an important role in fertility examination of the mare. It also helps the diagnosis of endometritis when clinical findings and culture results are not definite (Colahan et.al.,1999).

The aim of the study is to evaluate biopsy specimens from endometrium obtained during the first and fifth oestrus to determine initial microscopic status of endometrium and any changes in the endometrium that may have happened as a result of occluded cervix and analyze pregnancy rates after the experiment.

## **MATERIALS AND METHODS**

A total of 24 cycling light breed mares from MTT Agrifood Research and Equine College, Ypaja, Finland, were used in the study. Mares were 3–17 years old (mean 9.6 years), had no history of reproductive failure and were clinically healthy. This study was carried out from the beginning of April to early September 2007.

The study was designed as a cross-over study where each mare received two treatments one of which was control treatment thus serving as internal control. The mares were observed during 5 oestrus periods and during two of these periods (second and fourth oestrus) the treatment was applied. Treatments were as follows: Treatment A (TRT A) -- intrauterine catheter closed for 25 h, immediately after artificial insemination (AI) and occluded 65 –cm, 33fr diameter Bivona catheter (Equivet, Kruuse, Marslev, Denmark) was inserted into the uterus and the cuff was filled with a 80-ml of air. The catheter was occluded at the end opposite to the cuff so that no fluid could escape from the catheter. After 25h the catheter was opened and the fluid drained into a sterile Falcon cylinder. Treatment B (TRT B) -- intrauterine catheter closed for 6h+19 h, immediately after AI and a Bivona catheter was inserted as described for TRT A. The catheter was opened after 6h and fluid drained into a sterile Falcon cylinder. Then catheter was closed for another 19h after which it was opened and fluid collected as described above. Treatment C (TRT C) – control, no intrauterine catheter. A sterilized, regular-sized tampon (Tampax Inc., Palmer, MA, USA) with a long cotton string was placed within a 45-cm long plastic or metal tube which was inserted into the uterus by manual guidance through the cervix 25h after AI. A 53.5 cm long plastic AI catheter was used to push the tampon inside the uterus while the tube was withdrawn. After 20 minutes the tampon was removed through a sterilized speculum. Fluid absorbed into the tampon was squeezed out into a sterile plastic Falcon tube with a sterile garlic press.

For mares of all treatment groups uterine lavage was performed using 500 ml Ringer's solution (Ringer-Acetate Viaflo, Baxter) after the last manipulation (collection of intrauterine fluid in TRT A, TRT B and TRT C mares). All mares were given 10 IU oxytocin i/v during or after lavage. Mares were randomly assigned to 1 of 4 groups; group 1 (TRT C/A)- mares at the second oestrus was control (C) but at the fourth oestrus the same group received treatment A, group 2 (TRT A/C)- mares at the second oestrus received treatment A but at the fourth oestrus the same group was control, group 3 (TRT C/B)- mares at the second oestrus was control but at the fourth oestrus the same group received treatment B, group 4 (TRT B/C)- mares at the second oestrus received treatment B but at the fourth oestrus the same group was control.

Oestrus was synchronised with 0.25 mg cloprostenol i/m (Estrumate vet., Schering-Plough A/S Farum, Denmark). The mares were examined by transrectal palpation and

ultrasonography (Sono Site Vet 180 plus with a 5- MHz probe; Sono Site Inc., Bothell, WA, USA) on Monday, Wednesday and Friday. Relaxation of the cervix, the number and size of follicles, corpus luteum and the degree of endometrial oedema were assessed. It was presumed that the mare was in oestrus when a pre-ovulatory follicle of  $\geq 35$ mm was detected in association with uterine oedema and cervical softening. An approximate assessment of the amount of uterine fluid was made by measuring ultrasonographically the depth and length (height (mm) x width (mm)) of any pools of fluid in the uterus at the time of oestrus.

During the second and fourth oestrus mares were inseminated with pooled semen from 2 stallions using a standard AI catheter. Semen was collected using an automated phantom (Equidame®) and diluted with skim milk extender to get an insemination dose of  $500 \times 10^6$  progressively motile spermatozoa in a volume of 20 ml ( $250 \times 10^6$  from each stallion). All mares received an intravenous injection of 1500 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Chorulon®, Intervet International B.V., Boxmeer, The Netherlands) right after AI to synchronize ovulation. Palpation and ultrasonographic examination continued daily until ovulation was detected.

Pregnancy examination was done 15 – 17 days after AI by ultrasonography. Pregnant mares received 0.25 mg cloprostenol i.m (Estrumate vet., Schering- Plough A/S Farum, Denmark) to terminate the pregnancy.

Biopsy specimens from endometrium were obtained during the first and fifth oestrus to determine initial microscopic status of endometrium and changes in the endometrium such as inflammation and periglandular fibrosis that may have happened as a result of impaired uterine drainage.

Endometrial biopsy specimens were obtained from the ventral wall at the base of either horn at first and fifth oestrus and processed as described by Kenney (1978). The histological slides were evaluated and categorized according to Kenney and Doig (1986).

The biopsy slides were scored from 0 to 5 for the degree of inflammation according to intensity of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and mononuclear cells (MNS): score 0- no cells, 1- small, insistent infiltration or slight diffuse under the epithelium, 2- smolish, relatively frequent infiltrations or a slight to moderate diffuse infiltration, 3- small to medium, frequent infiltrations or a moderate diffuse infiltration, 4- moderate or large, frequent infiltrations or a strong diffuse infiltrations, 5- the entire biopsy is covered by inflammatory cells. At the same time periglandular fibrosis was scored as follows: 0- none, 1- infrequent, slight <2/field, 2- moderately frequent, slight, 2-5/field, 3- frequent, slight to moderate, 6-10/field, 4- very frequent, moderate to large, >10 fibrotic nests per field and 5- all glands are affected.

All specimens from a mare were pooled for processing and evaluated without knowledge of their origin.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Table 1 explains the changes of inflammation and periglandular fibrosis in endometrial histological samples obtained pre- and post- experiment (1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> oestrus). The value represent the percentage of mares with increased, decreased and the same status of degree of inflammation and periglandular fibrosis.

Table 1.

**Changes of inflammation and periglandular fibrosis in endometrial histological samples**

Inflammation score					Periglandular fibrosis			
	Group 1 (n=7) TRTC/A	Group 2 (n=6) TRTA/C	Group 3 (n=6) TRTC/B	Group 4 (n=4) TRTB/C	Group 1 (n=7) TRTC/A	Group 2 (n=6) TRTA/C	Group 3 (n=6) TRTC/B	Group 4 (n=4) TRTB/C
Increase	14.3	0	16.7	0	57.2	33.3	50	50
Decrease	42.9	0	50	50	0	16.7	16.7	0
The same	42.9	100	33.3	50	42.8	50	33.3	50

The increase of inflammation in mares endometrium compared with pre- and post-experiment were found in groups TRTC/A (14.3%) and group TRT C/B (16.7%). There was no increase in inflammation score in groups TRT A/C and group TRT C/B (0%). Half of the mares in all groups, except TRT A/C, had 50% decrease or remained the same inflammation score of pre and post experiment. At the same time all treatment groups showed an increase or with no changes (same) in periglandular fibrosis, except TRT A/C and TRT C/B where one mare in each group showed a decrease of periglandular fibrosis pre- and post- experiment. In general impaired uterine drainage did not increase inflammation score in endometrium pre- and post- experiment but there was an increase of periglandular fibrosis.

The pregnancy rates in mares with artificially occluded cervix are demonstrated in Table 2. As it was mentioned above each mare received two treatments one of which was control treatment thus serving as internal control.

Table 2.

**Pregnancy rates (%) after AI in 2nd and 4th oestrus period**

Group	Treatment	Pregnancy rate % after 2nd oestrus	Treatment	Pregnancy rate % after 4th oestrus
Group 1	TRT C	0 %	TRT A	14.3 %
Group 2	TRT A	66 %	TRT C	33.3 %
Group 3	TRT C	57 %	TRT B	0 %
Group 4	TRT B	50 %	TRT C	25 %

The results show that occlusion of the cervix might influence the pregnancy rates since the uterus could not clear itself from inflammatory cells such as polymorphonuclear leukocytes. None of the mares became pregnant from TRT C after the 2<sup>nd</sup> oestrus and TRT B after the 4<sup>th</sup> oestrus. At the same time, the same group had increased periglandular fibrosis in endometrium. In group 2 and 4 pregnancy rates after the 2<sup>nd</sup> oestrus were 66% and 50% and after the 4<sup>th</sup> oestrus pregnancy rates were decreased for 50 % (33.3% and 25%). Group 2 and 4 like group 1 and 3 had increased periglandular fibrosis in endometrium. It seems likely that occlusion of the cervix and increased periglandular fibrosis in endometrium has influenced the pregnancy rates. The influx of polymorphonuclear neutrophils (PMN) starts approximately 30 min after AI (Katila, 1995) and the peak of endometrial inflammation is reached 6 to 24 h post breeding. If the uterine clearance fails, pregnancy rates are reduced (Adams et al.,

1987). Reduced myometrial contractions, poor lymphatic drainage, large and overstretched uterus and cervical incompetence are predisposing factors for persistent mating-induced endometritis and, as Troedsson (1997) suggests, inflammation, especially repeated inflammation may result in degenerative changes of the endometrium and early embryonic death.

Pregnancy rates in all mares (Fig.1) were 2.5 times smaller after the 4th oestrus period (16.7%) than after the 2nd oestrus period (41.7%). These results also suggest that impaired uterine drainage affects the pregnancy rates.

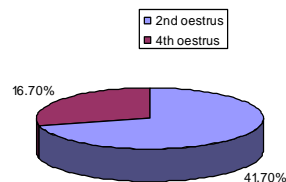


Figure 1. **Pregnancy rates (%) in all mares after the 2nd and 4th oestrus period**

## CONCLUSION

The impairment of uterine drainage increased periglandular fibrosis in endometrium and decreased pregnancy rates.

## REFERENCES

1. Colahan, P.T., Mayhew, A.M.M. and Moore, J.N.- *Manual of Equine Medicine and Surgery*, Mosby, Inc.1999; 312-359.
2. Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, E., Allen, W.R., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H.A.- Morphofunctional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis of uterine secretions-preliminary results. *Pferdeheilkunde*. 2003; 19 : 666-669.
3. Katila, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction*. Monograph. 1995; 1: 515-517.
4. Kenney, R.M. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1978; 172:241-262.
5. Kenney, R.M., Doig, P.A. Equine endometrial biopsy. In: *Morrow D.A. (Ed.) Current therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders.1986; 723-729.
6. Oddsdottir, C., Bjornsdottir, S., Riley, S.C., Watson, E.D. Development of endometrial fibrosis in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, Willey-Blackwell 2008; 43:25.
7. Ricketts, S. W., Alonso, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Veterinary Journal* 1991; 23:3:185–188.
8. Squires, E.L., Barness, C.K., Rowley, H.S., McKinnon, A.O., Pickett, B.W., Shideler, R.K. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. In: *Proceedings of the 35<sup>th</sup> Meeting of the American Association of Equine Practitioners*, Elsevier. 1989; 25-30.
9. Troedsson, M.H.T. Diseases of the uterus. In: *Robinson, N.D. (Ed.), Current therapy on Equine Medicine*. W.B Saunders. 1997; 517-523.

**STIRNU (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) UN STALTBRIEŽU (*CERVUS ELAPHUS*) GAĻAS BAKTERIĀLĀ PIESĀRŅŪMA NOTEIKŠANA PIELIETOJOT DAŽĀDAS MIKROBIOĻĢIJAS UN MOLEKULĀRĀS BIOĻĢIJAS METODES**

**DETECTION OF BACTERIAL POLLUTION OF ROE DEER'S (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) AND RED DEER'S (*CERVUS ELAPHUS*) MEAT USING CLASICAL MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY METHODS**

**Solveiga Liepina, Aleksandrs Jemeljanovs, Ināra-Helēna Konošonoka**

LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvia  
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine ”Sigra”, Latvia  
[sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

**ABSTRACT**

To get high quality game meat, it is very important to observe strict deer farming and transporting conditions. Microbiological control of the meat is important factor providing harmlessness of the food. Clasical microbiology and molecular biology methods were applied to detect microorganisms. Investigations on bacterial pollution of roe deer's (*Capreolus capreolus*) and red deer's (*Cervus elaphus*) meat reveled amount number of microbes in venisions. Ratio of the numbers of *Enterobacteriaceae* and count of total colony count culture was constant in all storage period of meat of both animal species, and the numbers of *Enterobacteriaceae* composes 60% of total bacterial count. When storing fresh meat of captive deer (*Cervus elaphus*) and wild animals at different temperatures of microorganisms of *Enterobacteriaceae* species whose growth are not limited predominate. Increase in colony forming units culture count in roe meat during storage was slower than in deer meat however growth rate of *Enterobacteriaceae* was higher than in deer meat. Analysed venison samples were not contained verotoxin-producing strains of *E.coli* thus proving that this meat is safe for customers. It was proven by the sequestration reaction of *E.coli* and by comparison of the obtained results with the database of microorganism genome available on the internet.

**KEY WORDS:** wild animals' meat, microbiological pollution.

**IEVADS**

Medījumu gaļa ir kvalitatīvs, cilvēka organisma fizioloģiskām prasībām atbilstošs uztur līdzeklis, kas raksturojas ar diētiskumu, augstu proteīna līmeni, to aminoskābju saturu un to optimālām attiecībām (triptopāns: oksiprolīns - 2 : 1), raksturojas ar augstu 33.7% nepiesātināto taukskābju saturu: linolskābe, linolēnskābe, arahidonskābe u.c., zemu holesterīna līmeni, optimālu muskuļaudu un taukaudu attiecību, augstu minerālvielu saturu, (Cu, Fe, Zn). Lai gan medījumu gaļas patēriņš nav liels, salīdzinot ar mājdzīvnieku (cūku, liellopu, putnu) gaļu, tomēr pieprasījums pēc tās pieaug, un šīs gaļas ieguve kļūst par nozīmīgu pārtikas ražošanas sastāvdaļu.

Vērtējot stirnu un briežu gaļas mikrobiālo piesārņojumu, ir jāvērtē zarnu nūjiņu klātbūtne (*E.coli*) mezofili aerobos, un fakultatīvi anaerobie mikroorganismus, kas plaši sastopami ārējā vidē, un līdz ar to viegli var kļūt par gaļas piesārņojuma cēloni. Ar pārtiku saistītās infekcijas slimības bieži vien izraisa patogēnie mikroorganismi, kas



nonāk cilvēka organismā ar dzīvnieku izcelsmes pārtiku. Patogēno baktēriju noteikšana ar tradicionālajām metodēm ir apgrūtināta, jo bieži mikroorganismi ir nelielā skaitā un tiek nomākti ar organismā esošo vietējo mikrofloru, ienāk jaunas metodes, kas ir precīzas. Modernajām tehnoloģijām pilnveidojoties, lai atvieglotu un paātrinātu patogēno mikroorganismu noteikšanu un paaugstinātu identifikācijas jutību, dažādu bakteriālo infekciju diagnostikā vienlaicīgi ar klasiskajām mikrobioloģijas metodēm aizvien vairāk izmanto molekulārās bioloģijas un ģenētisko izmeklējumu metodes (Olsen, 2000). Gaļas mikrobiālā kontrole ir svarīgs faktors pārtikas nekaitīguma nodrošināšanā. Šim nolūkam arvien vairāk tiek izmantotas tehnoloģijas, kas identificē un klasificē mikroorganismus DNS līmenī (Tutenel et al., 2003). Viena no biežāk izmantotajām metodēm ir polimerāzes ķēdes reakcija - PĶR (Olsen, 2000).

Mūsu **pētījuma** mērķis bija noskaidrot un izvērtēt savvaļas stirnu (*Capreolus capreolus*) un nebrīvē audzējamo staltbrīžu (*Cervus elaphus*) gaļas mikrobiālo piesārņojumu un tā pakāpi uzglabāšanas laikā dažādos temperatūras režīmos, šim nolūkam izvirzot sekojošus uzdevumus:

- 1) pētīt savvaļas dzīvnieku (*Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*) gaļas sākotnējo un turpmāk - glabāšanas laikā dažādās temperatūrās turētās gaļas mikrobiālo piesārņojumu, pielietojot klasiskās mikrobioloģijas metodes;
- 2) veikt mikroorganismu identifikāciju savvaļas dzīvnieku gaļā un to mikroorganismu atbilstību sugai, pielietojot molekulārās bioloģijas metodi – polimerāzes ķēdes reakciju;
- 3) salīdzināt ar mikrobioloģijas metodēm (klasisko) un PCR iegūtos rezultātus, vienlaicīgi nosakot, mikrobu celmos patogēnos verotoksīnus producējošus gēnus.

## MATERIĀLS UN METODES

Medību sezonas laikā no 2009. gada oktobra līdz 2010. gada janvārim medībās, vairākos medību kolektīvos, tika iegūti 20 stirnu (*Capreolus capreolus*) gaļas paraugi, bet no nebrīvē audzētiem 20 dzīvniekiem (*Cervus elaphus*) - gaļas paraugi iegūti divās brīžaudzētāju saimniecībās Vidzemē.

Saskaņā ar instrukciju, ievērojot standarta LVS ISO17604:2005 „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija, mikrobioloģiskai analīzei paredzētu paraugu ņemšana no liemeņa” atbilstošu metodiku, gaļas pārstrādes uzņēmumā no muskulatūras tika noņemti svaigas gaļas paraugi.

Pētot iegūto 40 svaigas gaļas paraugu (no 20 savvaļas stirnām un no 20 nebrīvē audzētiem brīžiem) mikrobioloģiskā piesārņojuma pakāpi, mikrobioloģiskās analīzes un molekulārās bioloģijas metode – polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR) tika veiktas LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskajā institūtā „Sigra”, nosakot sākotnējo gaļas paraugu mezofilo aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu (*MAFAM*) skaitu un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu vienlaicīgi. Ņemot vērā nepieciešamību noteikt optimālāko uzglabāšanas temperatūru, katras sugas dzīvnieku gaļas paraugi aseptiskos apstākļos tika sadalīti trīs daļās, turpmāk analizējamās gaļas paraugus ievietojot uz 168 stundām (7 diennaktīm) uzglabāšanas temperatūrās: +4°C, +8°C, +20 °C. Gaļas paraugu mikrobioloģiskie izmeklējumi tika veikti pēc 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 un 168 stundām augstākminētās temperatūrās uzglabātiem gaļas paraugiem. Iegūtie rezultāti tika savstarpēji salīdzināti.

Paraugu sagatavošana mikrobioloģiskai testēšanai tika veikta saskaņā ar standarta „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Testēšanas paraugu, sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošana mikrobioloģiskām pārbaudēm. 2. daļa. Īpaši noteikumi kā sagatavot gaļu un gaļas izstrādājumus” (LVS EN ISO 6887, 2,

2004). Atšķaidījumu pagatavošanai tika izmantots sāls-peptona šķīdums (*Maximum recovery diluent, OXOID, CM0733*). Visi mikrobioloģiskie izmeklējumi tika veikti saskaņā ar vispārpieņemtām metodikām.

Lai apstiprinātu mikrobioloģiskās analīzēs konstatēto *Escherichia coli* (*E.coli*) klātbūtni gaļas paraugos un izolētās *E.coli* celmu tīrkultūras, pielietojot randomizācijas metodi, 10% izmeklējumiem papildus klasiskajām mikrobioloģiskajām metodēm - 8 gaļas paraugu un 8 *E.coli* celmu tīrkultūras analīzēm, tika izmantota PĶR tehnika. PĶR reakciju arī veicām, lai noskaidrotu, vai kāds no celmiem nesatur patogēnos toksīnus producējošos gēnus VT1, VT2 un intīmāna gēnu *eaeA*, kuri kalpo kā piesaistes vieta toksīniem.

Ar PĶR izdalītās *E.coli* identifikācija tika pārbaudīta, iegūtos datus saskaņojot ar Nacionālā centra biotehnoloģiskās informācijas datu bāzi („*National Center for Biotechnology Information*”). Pārbaudot sekvenčēšanas datu korektumu, izmantojām „Sekvences salīdzināšanas datu bāzi” („*Sequence Similarity Search – Blast*”).

Mikroorganismu koloniju veidojošo vienību absolūtais skaits tika izteikts logaritmos pie bāzes 10. Datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm. Metožu novērtējumam un salīdzinājumam izmantota regresijas analīze, izmaiņu būtiskums pārbaudīts ar dispersiju salīdzinošiem testiem.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Veiktās paraugu analīzes, pirms ievietošanas uzglabāšanai metodikā noteiktajās temperatūrās, parādīja ievērojamu gaļas virsmas mikrobioloģisko piesārņojumu: baktēriju kvv g<sup>-1</sup> kopskaita lg bija 7.41 stirnu gaļai un kvv g<sup>-1</sup> lg 6.84 briežu gaļai, bet enterobaktēriju kopskaits - attiecīgi kvv g<sup>-1</sup> lg 3.87 un 3.96. Iegūtie rezultāti parādīja, ka, stirnu un briežu gaļas mikrobiālais piesārņojums pirms ievietošanas uzglabāšanai sasniedza sekojošas robežvērtības 5 × 10<sup>6</sup> kvv g<sup>-1</sup> (10<sup>6</sup> = lg 6).

Mūsu rezultāti sakrīt ar citu pētnieku (H. Zaube, M.Šraiters) Заупе, Шрайтер (1985) un Lawrie (2006) iegūtiem datiem, ka pārtikas higiēnas prasībām atbilstoša gaļas kvalitāte saglabājas temperatūras robežās no 0 līdz -10 °C. Vairumam baktēriju -10 °C temperatūras apstājas augšana un vairošanās, līdz ar to tiek pārtraukta arī taukus un proteīnus šķeļošo fermentu veidošanās procesi.

Identificējot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas sugu līmenī, konstatējām, ka visbiežāk gaļu kontaminēja *Escherichia coli*, *Escherichia freundii*, *Hafnia alvei*, *Kluyvera cryocrescens*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*. Kā briežu gaļas sporādisks infekcijas avots literatūras datos tiek minēts *E.coli O157:H7* (Carter, 1990; Rabatsky-Ehr et al., 2002).

Mūsu pētījums atklāj, ka MAFAM kvv g<sup>-1</sup> kopskaita lg stirnas gaļai, uzglabājot 168 stundas +4 °C temperatūrā, pieauga no 7.41 pirms uzglabāšanas uzsākšanas līdz 9.55, bet staltbriežu gaļai - kvv g<sup>-1</sup> kopskaita lg atbilstoši no 6.84 līdz 9.40. Arī enterobaktēriju skaits kā stirnu gaļā, tā arī briežu gaļā pieauga līdzvērtīgi.

Uzglabājot gaļu +8 °C temperatūrā 168 stundas, MAFAM kopskaits stirnu gaļai pieauga no 7.20 pirms uzglabāšanas uzsākšanas līdz 9.73 lg kvv g<sup>-1</sup>, bet staltbriežu gaļai atbilstoši no 6.84 līdz 9.94 lg kvv g<sup>-1</sup>. Tā kā gaļas paraugi jau pirms ievietošanas uzglabāšanai +8 °C temperatūrā bija stipri kontaminēti, tad uzglabāšanas laikā MAFAM skaits 1.5 reizes pārsniedza nekaitīguma kritērijus abām grupām. Kā stirnu gaļā, tā arī staltbriežu gaļā palielinājās arī *Enterobacteriaceae* baktēriju skaits.

Lai pārbaudītu klasisko mikrobioloģijas metožu un PĶR reakcijas datu sakrītību, pirmais tīrkultūras paraugs tika izvēlēts sekvenčēšanas reakcijas veikšanai, kas arī ir bieži izmantojama metode bakteriālo infekciju konstatēšanā. Pētījumi atklāja, ka neviens no 8

izvēlētajiem *E.coli* celmu paraugiem nesaturēja ne verocitotoksīnus producējošos gēnus, ne intimīna gēnu *eaeA*, tādējādi pierādot, ka gaļa droši izmantojama pārtikā.

Veicot *E.coli* DNS sekvenēšanas reakciju un mūsu iegūtos rezultātus salīdzinot ar internetā pieejamo mikroorganismu genomu datubāzi, varējām konstatēt, ka izolētās tūrkultūras atbilst *E.coli* 16S rDNS rajonam, tādējādi apstiprinot veikto tradicionālo mikrobioloģisko metožu korektumu ( *National Center for Biotechnology Information*, „*Sequence Similarity Search*”).

## SECINĀJUMI

1. Pieaugot stirnu (*Capreolus, capreolus*) un nebrīvē audzējamo staltbriežu (*Cervus elaphus*) svaigas gaļas uzglabāšanas ilgumam, attiecīgi, pieaug arī MAFAM un *Enterobacteriaceae* skaits visos uzglabāšanas temperatūru režīmos.
2. Abu sugu dzīvnieku gaļas uzglabāšanas periodā (168 stundas) MAFAM un enterobaktēriju skaita attiecība bija konstanta un enterobaktēriju skaits sastādīja apmēram 60% no kopējo baktēriju skaita.
3. Savvaļas dzīvnieku un nebrīvē audzējamo staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļā uzglabājot temperatūrā +4°C +8°C +20°C, dominē *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi, kuru augšana minētajās temperatūrās netiek kavēta.
4. Gaļas uzglabāšanas laikā MAFAM skaita palielināšanās stirnu gaļā bija lēnāka nekā staltbriežu gaļā, bet enterobaktēriju augšanas ātrums straujāks nekā briežu gaļā, izņemot +20°C uzglabāšanas temperatūru, kad enterobaktēriju augšanas ātrums stirnu gaļā bija straujāks, salīdzinot ar staltbriežu gaļu.
5. Veicot *E.coli* DNS sekvenēšanas reakciju un iegūtos rezultātus salīdzinot ar internetā pieejamo mikroorganismu genomu datubāzi, varējām konstatēt, ka izolētās tūrkultūras atbilst *E.coli* 16S rDNS rajonam, parādot veikto mikrobioloģisko metožu korektumu.

## LITERATŪRA

1. Carter, M.E. Enterobacteria. In: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Carter, M.E., Cole, J.R. (eds.). 5th ed. Academic Press. San. Diego. 1990; 3 – 11.
2. Lawrie, R.A. *Meat Science*. 7th edition, 2006; 456.
3. National Center for Biotechnology Information. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
4. Olsen, J.E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International* 33 2000; 257-266.
5. [Rabatsky-Ehr T, Dingman D, Marcus R, Howard R, Kinney A, Mshar P](#). Deer meat as the source for a sporadic case of Escherichia coli O157:H7 infection // [Emerging Infectious Diseases](#), 2002 May; 8(5):525-7.
6. Sequence Similarity Search – Blast. <http://blast.genome.jp/>
7. Tuteneel, A.V., Pierard, D., Van Hoof, J., Cornelis, M., De Zutter, L. Isolation and molecular characterization of Escherichia coli O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 2003; 63 - 69.
8. Заупе Х., Шрайтер М. Микробиология продуктов животного происхождения. (Перевод с немецкого) Дрезден, 1985; 34-63.

# SARKOCISTOZE MĀJAS UN MEŽA CŪKĀM

## SARCOCYSTOSIS OF PIGS AND WILD BOAR

**Ruta Medne, Anna Krūklīte, Kristīne Šteina**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[Ruta.Medne@llu.lv](mailto:Ruta.Medne@llu.lv)

### ABSTRACT

Sarcocystosis is zoonotic disease. In sarcocystosis, the endothelium and muscles and other soft tissues are invaded by protozoans of the genus *Sarcocystis*. Intermediate hosts of sarcocystosis are human, horses, cattle, sheep, goats, pigs, birds, rodents, camelids, wildlife, and reptiles. In our investigation we were clarifying distribution of *Sarcocystis* sp. in pig and wild boar. Of 491 pig (364 wild boar, 127 pig) was examined that 9.8 % were found to contain *Sarcocystis*. Extensity of infection in wild boar was from 4.3 % (in year 2009) to 14.3% (year 2010). The number of cysts per case in wild boar varied from 0.18 (2008) up to 175.20 (2010). In home pig *Sarcocystis* was found in two case and in one of them was generalized sarcocystosis.

**KEY WORDS:** sarcocystosis, pigs, wild boar, meat.

### IEVADS

Cilvēki savā ikdienas uzturā pamatā lieto dažādus gaļas produktus – mājputnu, liellopu, mājas cūku, meža cūku gaļu u.c. Lai patērētājs saņemtu veselībai drošu un kvalitatīvu pārtiku, gaļu pārbauda uz dažādām parazitozēm, cūkgaļai pamatā – cisticerkozi un trihinelozi. Taču gaļas kvalitāti nosaka ne tikai minētās, bet arī citas parazitozes, kuras ES nav noteiktas kā obligāti diagnosticējamās. Viena no šādām parazitozēm ir sarkocistoze. To ierosina vairākas sugas – *Sarcocystis suis hominis*, *S. miescheriana*, *S. porcifelis* (Taylor et al., 2007; Fayer, 2004; Georgi, 1980).

Sarkocistas ir viensūnas organismi, ģints *Sarcocystis*, dzimta *Sarcocystidae*, kārta *Eucoccidiida*, klase *Sporozoa*. Dzīvnieka organismā sarkocistas sastop divās formās – cistas (Mišera maisiņi) un trofozoīti (Taylor et al., 2007; Georgi, 1980).

Cistu lokalizējas muskuļšķiedrās un var būt cilindriskas, spirālveidīgas, elipsveidīgas vai neizteiksmīgas formas. Izmēri variē no dažiem mikroniem līdz 10 – 20 mm. Cistas ir pildītas ar trofozoītiem (citomēriem, endodiocītiem), ko agrāk definēja kā sporas (Taylor et al., 2007; Georgi, 1980).

Trofozoīti – biežāk banānveida, retāk sirpjveida, spirālveida, ovālas, apaļas formas, garums 6 – 15 μm, platums 2 – 7 μm. Nokļūstot muskuļaudos, trofozoīti nogulsnējas vietās, kur ir vairāk sarkoplazmas, tur pārvēršas par ovālām (*S.tenella*) vai apaļām (*S.miescheriana*) šūnām un pēc tam dalās plazmatomijas ceļā (Taylor et al., 2007; Georgi, 1980).

Sarkocistozes ierosinātāju attīstība norit ar divu saimnieku maiņu. *Sarcocystis* spp. patoģenitāte ir atkarīga no parazīta sugas un attīstības stadijas. Ar sarkocistām invadētiem dzīvniekiem, ne vienmēr ir izteiktas slimības klīniskās pazīmes un patoloģiskās izmaiņas muskuļaudos. Tas izskaidrojams ar to, ka cistu stadijā parazītu vielmaiņas procesi ir pazemināti un audu reakcija uz to klātbūtni ir zema (Taylor et al., 2007; Georgi, 1980).

Atkarībā no sarkocistu sugas, definitīvie saimnieki ir suņi, kaķi vai cilvēki. Definitīvais saimnieks apēdot invadētu gaļu, saslimst ar sarkocistozes zarnu formu (Fayer, 2004).

Cilvēks invadējas lietojot pārtikā invadētu gaļu. Inkubācijas periods nav noteikts. Slimojot ar enterālo sarkocistozi, novēro diareju, nelabumu, vājumu. Slimību izraisa *S.hominis*, *S.suihominis* un *S.bovihominis*. Inkubācijas periods 4 – 8 stundas, prepatentais periods 5 – 10 dienas, patentais periods 6 - 8 nedēļas. Sporocistu izdalīšanās ar fekālijām sākas 10 – 13 dienā pēc invadēšanās un var ilgt līdz 6 mēnešiem. *S.lindemanni* ierosina muskuļu sarkocistozi cilvēkiem. Cilvēks invadējas norijot sporoziotus. Attīstība notiek kā starpsaimniekā asinsvados, limfvados, skeleta muskulatūrā, miokardā veidojot sarkocistas (Fayer, 2004).

Cūkām nelielas vai vidējas invāzijas gadījumā slimība norit bez simptomiem. Intensīvas invāzijas gadījumā novēro diareju, īslaicīgas paralīzes, anoreksiju, drudzi, anēmiju, svāra zudumu, apātiju un dažreiz izgulējumus, kā arī endokardītu un miokardītu. Sivēniem nomākums, temperatūras paaugstināšanās, anoreksija un izteiktas klīniskās saslimšanas pazīmes 10 – 13 dienā pēc invadēšanās (arī citām dzīvnieku sugām). Grūsnām sivēnmātēm sarkocistu invāzija var izraisīt abortus. Veidojas zarnu hemorāģisks iekaisums, gremošanas traucējumi, asins izlijumi galvas smadzenēs, kas var būt par iemeslu dažādu neirožu izpausmēm, kuras novērojamas sarkocistozes gadījumā (Porter, Kaplan, 2005; Fayer, 2004).

Sarkocistas cūkgaļā var iznīcināt, gaļu gatavojot 70°C 15 min, sasaldējot – 4°C 2 dienas, vai sasaldējot - 20°C vienu dienu. Ja muskuļos atrod tikai sarkosporidijas un tajos nav patoloģisku pārmaiņu, tad gaļu realizē brīvi, ja atrod Mišera maisījumus un muskuļu pārmaiņas, t.i., tie ir hidrēmiski, stipri gaiši vai arī tajos ir pārkaļķojumi, tad liemeni utilizē. Visu dzīvnieku iešu taukus un cūku speķi var realizēt brīvi. Stipri invadētus liemeņus un iekšējos orgānus brāķē un utilizē.

Pēc Eiropas Savienības direktīvas 91/497/EEK par veselības problēmām, kas ietekmē Kopienas tirdzniecību ar svaigu gaļu, lai to attiecinātu uz svaigas gaļas ražošanu un tirdzniecību. Direktīva nosaka, ka valsts pilnvarots veterinārārsts atzīst par nederīgu lietošanai pārtikā, dzīvnieku gaļu, kurā ir konstatēta ģeneralizēta sarkocistoze.

Mūsu darba mērķis bija noteikt *Sarcocystis* spp. invāzijas izplatību meža un mājas cūkām.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījums veikts Latvijas Lauksaimniecības universitātes, Veterinārmedicīnas fakultātes, Pārtikas un vides higiēnas institūta, Parazitoloģijas mācību laboratorijā. Laikā no 2007. gada septembra līdz 2010. gada aprīlim. Pētījumā izmeklētas 364 meža, 127 mājas cūkas. Paraugi iegūti kautuvēs un no dažādos medību kolektīvos nomedītām meža cūkām.

Izmeklēšanai izmantojām 10 g meža un māju cūku šķērsvītrotu muskuļaudu paraugus - diafragmas kājiņas, importētai cūkgaļai starpribu muskulatūru. Lai noteiktu sarkocistu klātbūtni izmeklējamajos paraugos tika izmantotas sekojošas metodes: makroskopiskā novērtēšana, muskuļaudu kompresijas metode; sagremošana mākslīgā kuņģa sulā; histoloģiskā (diagnozes precizēšanai).

Noteicām invadēšanās pakāpi, nosakot: invāzijas ekstensitāte (IE) un invāzijas intensitāte (II).

Invāzijas ekstensitāti aprēķinājām, kā invadēto dzīvnieku procentuālo attiecību pret visu dzīvnieku skaitu izmeklējumu grupā.

Invāzijas intensitāti aprēķinājām pēc formulas:

$II = X \pm Sx$  (*lim X min ... X max*), kur

$X \pm Sx$  – parazitū skaits vidēji uz vienu dzīvnieku

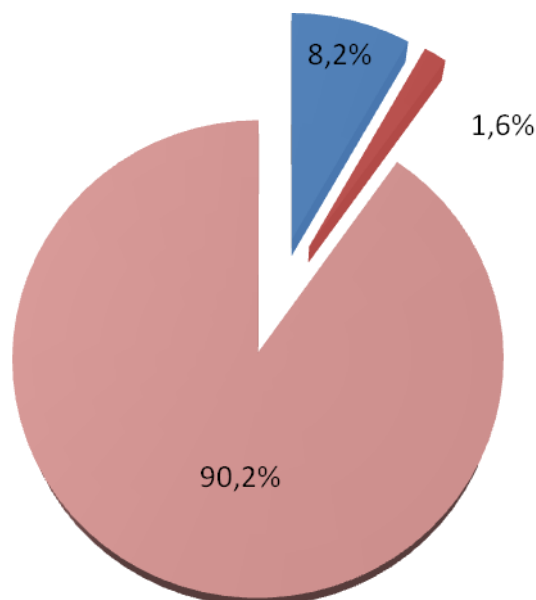
$X$  – aritmētiskais vidējais un  $Sx$  – standartklūda

(*lim X min ... X max*) – mazākais un lielākais parazitū skaits atsevišķiem dzīvniekiem (Keidāns u.c. 2008).

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Makroskopiskās izmeklēšanas laikā noteicām, ka sarkocistas ir dažāda lieluma un bieži ir redzamas ar neapbruņotu aci- makrosarkocistas. Makrosarkocistas atradām tikai vienā gadījumā- mājas cūku gaļā, audos bija labi redzamas sarkocistu invāzijas radītās izmaiņas muskuļaudos – pārkaļķojumi prosas graudu lielumā, apkārtējie audi gaiši.

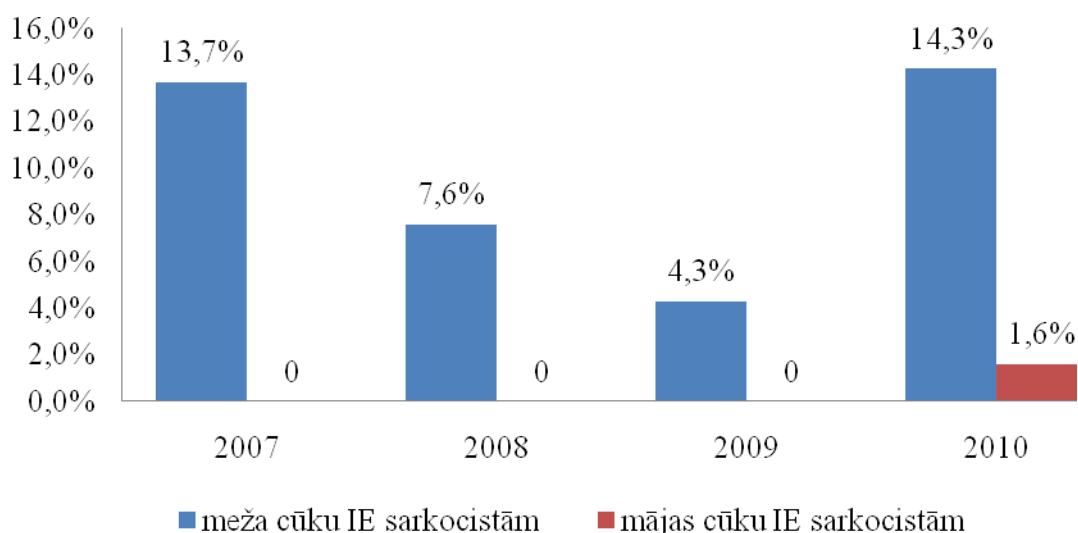
Muskulatūras paraugus izmeklējām arī mikroskopiski, izmantojot kompresijas metodi un sagremošanu mākslīgā kuņģa sulā. Mikrosarkocistas ir labi saskatāmas ar kompresijas metodi, histoloģiskajos griezumos un atrodamas nesagremotajā masā, izmeklējot ar mākslīgās sagremošanas metodi.



1.attēls. Meža un mājas cūku sarkocistozes invāzijas ekstensitāte (%)

Figure 1. Infection extensity (%) of sarcocystosis of wild boar and pigs

Izmeklētajos meža un mājas cūku paraugos 9.8% gadījumu atradām sarkocistu invāziju (1.att.): 8.2% gadījumu bija invadētas meža cūkas, bet tikai 1.6% mājas cūkas. No izmeklētajiem 364 meža cūku muskuļaudu paraugiem 30 paraugos diagnosticējām sarkocistas (IE 8.2%), mājas cūkām no 127 paraugiem sarkocistozi diagnosticējām divos paraugos (IE 1,6 %) Eiropā sarkocistoze reģistrēta 61% liellopu, Irānā liellopiem sarkocistozes IE ir 89% (Oryan et al., 2010). Vācijā invadēti 63% liellopu, 5% cūku Bet cūku invāzija ar sarkocistozi pasaulē ir zemāka no 3-36% (Fayer, 2004).



2. attēls. **Meža un mājas cūku sarkocistozes invāzijas ekstensitāte (IE) izmaiņas pa gadiem**

Figure 2. **Infection extensity (%) of sarcocystosis of wild boar and pigs**

Literatūrā neatradām datus par mežacūku sarkocistozi pasaulē. Mūsu pētījumā meža cūkām sarkocistu IE dažādos gados atšķīrās, visaugstākā tā bija 2010. gadā – 14,3%, bet viszemākā 2009. gadā – 4,3%. Mājas cūkām sarkocistozi diagnosticējām tikai 2010. gadā, pie kam invadēti bija tikai divi paraugi un viens no tiem ar ģeneralizētām muskuļaudu izmaiņām, kas norāda uz augstu invāzijas intensitāti.

Cilvēka saslimšanu nosaka ne tikai parazītu klātbūtne gaļā, bet arī to daudzums. Tāpēc noteicām invāzijas intensitāti: t.i parazītu daudzumu. Parazītu skaits (II), vienā paraugā 10 g gaļas, variēja no 1 līdz 120. Invāzijas intensitāte pēdējā gadā ir lielāka  $175.2 \pm 11.06$  (1. tab.).

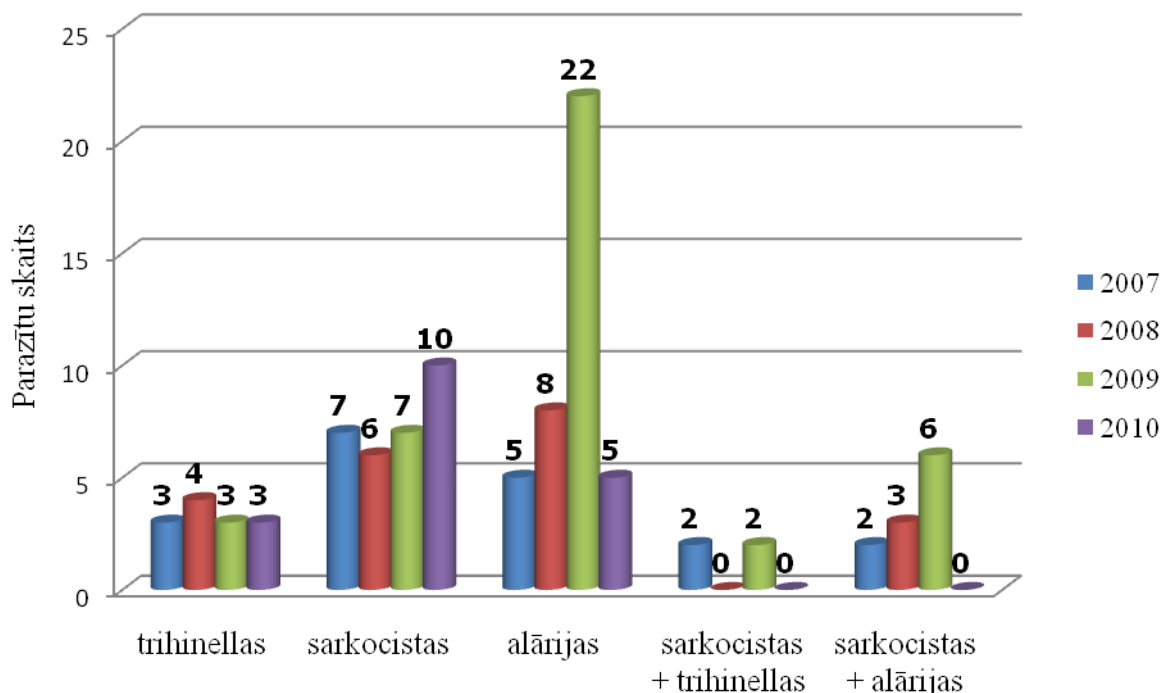
1. tabula/Table 1

**Sarkocistozes invāzijas intensitāte (II) meža cūku gaļā**  
**Infection intensity (II) of sarcocystosis of wild boar meat**

Gads	Invāzijas intensitāte $x \pm s$
2007	$0,32 \pm 0,42$
2008	$0,18 \pm 0,33$
2009	$0,21 \pm 0,35$
2010	$175,20 \pm 11,06$

Sarkocistozes laboratoriskajā diferenciāldiagnostikā jāņem vērā iespējamās biocenozes.

Apskatot un novērtējot izmeklēšanai paredzētos cūku gaļas paraugus īpaši pievēršām uzmanību iespējamai makrosarkocistu invāzijas diferenciāldiagnostikai no *Cistycercus celulosae* invāzijas. *Cistycercus celulosae* invāzija netika konstatēta.



3.1. attēls. **Izmeklējumos uz sarkocistozi meža cūkas gaļā vienlaicīgi diagnosticētie citu sugu parazīti**

Vienlaicīgi dzīvniekā var parazitēt vairākas parazītu sugas, tādēļ noteicām biocenozi. *Sarcocystis sp.* kopā ar *Trichinella sp.* ir atrastas 2 paraugos 2007. gadā un divos - 2009. gadā (kopā 0.8 % gadījumu). Biežāk sastopama biocenoze: *Sarcocystis sp* un *Alaria alata*, kas 2009. gadā bija diagnosticēta 6 paraugos (3 % gadījumu).

Savukārt, sarkocistu monoinvāzija tika diagnosticēta 8.2 %. Biocenozē parādījās, ka cūkām invadētām ar Sarkocistām ne vienmēr jābūt invadētām ar citiem muskuļaudu parazītiem.

## SECINĀJUMI

1. Meža cūkām sarkocistu invāzijas ekstensitāte bija 14.3%, mājas cūkām IE 1.6%;
2. Meža cūkām augstāka sarkocistu invāzijas ekstensitāte salīdzinot ar mājas cūkām liek domāt par mežā dzīvojošo gaļēdāju (definitīvo saimnieku) lomu sarkocistu izplatībā;
3. Muskuļaudos bez sarkocistām iespējama citu sugu parazītu klātbūtne (trihinelu kāpuri un alāriju mezocerkāriji).

## LITERATŪRA

1. Keidāns, P., Krūklīte A., Keidāne D. Mājdzīvnieku parazitāro slimību diagnostika un profilakse, LLU, Jelgava, 2008; 137.
2. Georgi, J.R., Parasitology for Veterinarians, Third Edition – USA, W.B. Saunders Company, 1980; 460.
3. Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L, Veterinary parasitology, Third Edition, Blackwell Publishing, 2007; 874.
4. Porter, R., Kaplan J.L., The Merck Veterinary Manual Ninth Edition, Merck and Co, INC, Whitehouse Station, N. J., U.S.A. 2005; 2712.



5. Oryan, A., Ahmadi N. and Mousavi S. M .M. Prevalence, biology, and distribution pattern of Sarcocystis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Iran *Tropical Animal Health and Production* Vol. 42, N. 7: 2010.
6. Fayer, R. Sarcocystis spp. in Human Infections *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 894–902.
7. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:03:12:31991L0497:LV:PDF>  
resurss apskatīts 26.08.2010

# MĀKSLĪGI RADĪTĀ LAŠU SPURU NEKROZE

## ARTIFICIAL INDUCED SALMON FIN NECROSIS

**Ruta Medne, Edgars Liepiņš**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

### ABSTRACT

Fin necrosis is a progressive necrotic disease of many fish species. Several bacteria have been implicated in the etiology of the disease. To determine the bacteria associated with the disease in Baltic salmon, fish were sampled on hatcheries around the year. For determination of *Aeromonas* virulence, fish were artificially infected with *A. salmonicidae* and *A. hydrophila*.

**KEY WORDS:** salmon, fin necrosis, *Aeromonas* spp.

### IEVADS

Lielākā daļa zivju slimības izraisīto baktēriju ir ūdens vides parastie iemītnieki, un parastos apstākļos tie nerada nekādas problēmas. Tomēr zivīm, kuras atrodas viena vai vairāku negatīvu faktoru ietekmē (krasas temperatūras izmaiņas, slikta ūdens kvalitāte, transportēšana vai dažādas manipulācijas) var radīt stresu un novājināt imūnsistēmu. Tādas zivis kļūst daudz uzņēmīgākas pret bakteriālajām infekcijām. Turklāt stresa faktori, kas izjauc zivju imūnās sistēmas līdzsvaru, var palielināt zivju saslimšanas uzliesmojuma risku arī nākotnē (Stoskopf, 1993; Pippet et al., 1982). Slimības ātrāk attīstās siltā ūdenī- pavasarī, vasarā, turpretī ziemas laikā tā pāriet latentā formā- tas ir zivju mirstība samazinās, klīniskās pazīmes izzūd, taču ierosinātais joprojām atrodas zivīs un ūdenī un gaida labvēlīgāku laiku (Stoskopf, 1993; Pippet et al., 1982).

Zivīm patogēnas galvenokārt ir gramnegatīvās un dažas grampozitīvās baktērijas. Dažādu zivju bakterioloģisko slimību ierosinātāji (*Aeromonas*, *Pseudomonas* *gintis* u.c.) plaši izplatīti ūdenstilpes sedimentā. Tā bakterioloģiskā analīzē visplašāk sastopamas *Aeromonas hydrophila* 24 - 33% gadījumā. Tā ir biežāk no zivīm izolētā patogēnā *Aeromonas* ģints baktērija, kura izsauc karpu, zandartu, līdaku, lašu u.c. zivju, kā arī cilvēka saslimšanu (Hazen et al., 1978; Paniagua et al., 1990; Mateos et al., 1992; Kawula et al., 1996; Nielsen et al., 2001; Gonzalez et al., 2001; Sechi et al., 2002) Lašveidīgajām zivīm smagu saslimšanu miksobakteriozi izsauc *Flavobacterium* spp. (Pippet et al., 1982; Stoskopf, 1993).

Baktērijas var izraisīt arī zivs spuru saslimšanu. Spuras ir zivs kustību orgāns, tām ir svarīga nozīme dažādu manevru veikšanā. Spuru patoloģiju pētījumi pasaulē notiek divu svarīgu iemeslu dēļ: pirmkārt, lai palielinātu zivju izdzīvošanas iespējas dabiskā vidē pēc zivju izlaišanas no audzētavām, otrkārt estētiskais faktors- makšķerniekiem un pircējiem labāk patīk zivis ar veselām spurām. Vairāk pētītas ir dzīves laikā iegūtās spuru patoloģijas: spuru nekroze/puve, deformācijas, defekti (Khan et al., 1981; Lakshmanaperumalsamy et al., 1984; Clayton et al., 1998; Lang et al., 1999; Van den Heuvel, et.al., 2000).

Spuru nekroze un/vai spuru puve ir aprakstīta vairākām zivju sugām: zandartiem (Wiklund, Bylund, 1995; Van den Heuvel, et al., 2000), karpām (Kirubaharan et al., 1995), varavīksnes forelēm (Holm, 1988; Noble, Summerfelt, 1996; Moutou et al.,

1998), plekstēm (Atallah et al., 1998; Lang et al., 1999; Bangaramma et al. 1999), skumbrijām (Khan et al., 1981; Lakshmanaperumalsamy et al., 1984;) u.c.

Latvijā ir aktuāla problēma spuru nekroze zivju audzētavās Valsts zivju atražošanas programmas ietvaros audzētajiem lašu mazuļiem.

**Darba mērķis** pierādīt spuru nekrozes etioloģisko faktoru.

## MATERIĀLS UN METODIKA

Darbu izstrādāja no 2000. līdz 2003. gadam Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas un vides higiēnas institūtā, Latvijas zivsaimniecības pētniecības institūta Akvakultūras laboratorijā.

Bakterioloģiskajai analīzei zivis ieguva valsts zivju audzētavās. Spuru bojājumus iedalīja trijās grupās: pirmā- sadzijusi brūce un vesela spura (B-1), otrā- akūta progresējoša nekroze (B-2), trešā- spuras vietā izveidojusies čūla (B-3).

Lašu mākslīgo inficēšanu ar baktērijām *A. salmonicidae* un *A. hydrophila* veica, LZPI Akvakultūras laboratorijas akvāriju telpā.

Bioraudzei, lai pierādītu *A. salmonicidae* un *A. hydrophila* ietekmi uz spuru nekrozes veidošanos, izmantoja Baltijas laša mazuļus, kas audzēti specializētās lašu audzētavas inkubatorā.

Eksperimentu veica stikla akvārijos ar zivju izvietojamu platību 0.5 m<sup>2</sup> katram. Akvāriji bija aprīkoti ar ūdens temperatūras regulētājiem un aeratoriem. Ūdens temperatūru uzturēja 18 ± 1.3 °C, skābekli - 5 g/L un kontrolēja 2 reizes dienā ar oksimetru DO - 300.

Veica trīs pētījumu sērijas, izmantojot dažādus inficēšanas veidus. Izveidoja 9 zivju grupas, katrā 14 laši ar vidējo garumu 6.0 ± 0.3 cm. Zivis līdz eksperimentam inkubētas un audzētas specializētajā lašu audzētavā, izmantojot avota ūdeni. Visas zivis bija klīniski veselas, ar sugai raksturīgu uzvedību. Pirms inficēšanas manipulācijām lašus anestezēja ar 2-metilhinolīnu (hinaldīnu), izmantojot vannošanas metodi. Anestēzijas līdzekļa deva 10 mg/L ūdens.

Pirmā pētījuma zivīm injicēja baktēriju suspensiju vēdera dobumā. Katrai eksperimentā iekļautajai zivij vēdera dobumā, netraumējot iekšējos orgānus, ar šļirci ievadīja baktēriju suspensiju 0.5 mL ar koncentrāciju 1.5 x 10<sup>4</sup> KVV. I-1 grupas zivīm injicēja *A. hydrophila* baktēriju suspensiju, I-2 grupas zivīm injicēja *A. salmonicidae* baktēriju suspensiju, bet I-K grupai injicējām 0.5 mL sterilu fizioloģisko šķīdumu.

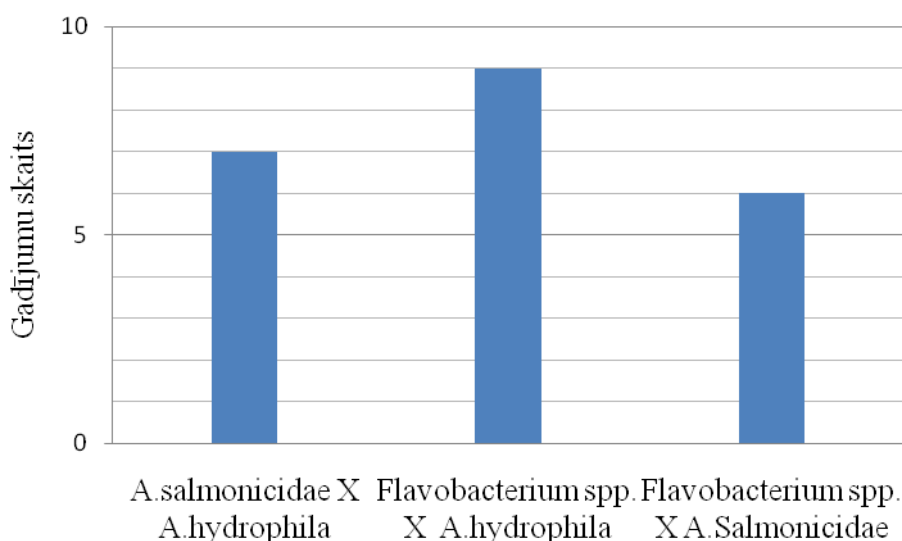
Otrā pētījuma sērijas zivis vannoja baktēriju suspensijā: 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. hydrophila* baktēriju suspensijā 1.5 x 10<sup>4</sup> KVV /mL<sup>-1</sup> (V-1) un 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. salmonicidae* baktēriju suspensijā 1.5 x 10<sup>4</sup> KVV /mL<sup>-1</sup> (V-2). Kontroles grupā iekļautos lašus izturēja tīrā ūdenī, radot eksperimenta grupām līdzīgus apstākļus (V-K).

Trešā pētījuma zivīm pirms vannošanas baktēriju suspensijā, muguras spurā radīja brūci- veica spuras daļas ekstirpāciju. Radušos brūci neapstrādāja ar antiseptiskiem līdzekļiem, tādējādi imitējot dabiski radušos brūci, zivij dzīvojot baseinā. Pēc operācijas zivis vannoja baktēriju suspensijā: 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. hydrophila* baktēriju suspensijā 1.5 x 10<sup>4</sup> KVV /mL<sup>-1</sup> (VB-1) un 14 laši, kurus 24 h vannoja *A. salmonicidae* baktēriju suspensijā 1.5 x 10<sup>4</sup> KVV /mL<sup>-1</sup> (VB-2). Kontroles grupā iekļautajiem lašiem veica iegriezumu muguras spurā, pēc tam izturēja tīrā ūdenī, radot eksperimenta grupām līdzīgus apstākļus (VB-K).

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

No lašu spuru audiem izolēti ģinšu *Aeromonas*, *Flavobacterium* un *Pseudomonas* mikroorganismi. Vairumā gadījumu izolēta viena baktēriju sugu (1. att.), tomēr bija gadījumi, kad uz slimajām spurām bija divas patogēno baktēriju sugas. Vairāk par divām baktēriju sugām vienai zivij neatrada nevienā no izmeklētajiem gadījumiem. No veselām spurām visos gadījumos izolēta tikai viena patogēno baktēriju sugu.

Maišinfekcija konstatēta 22 gadījumos. Dažādās kombinācijās atrasta ģinšu *Aeromonas* un *Flavobacterium* baktērijas. Savukārt *Pseudomonas* ģints baktērija, visos diagnosticētajos gadījumos bija vienīgā patogēnā ģints pārstāve.



### 1. attēls. Baktēriju kombinācija maišinfekcijas gadījumā

Figure 1. **Combination of bacteria in case of miscellaneous infection**

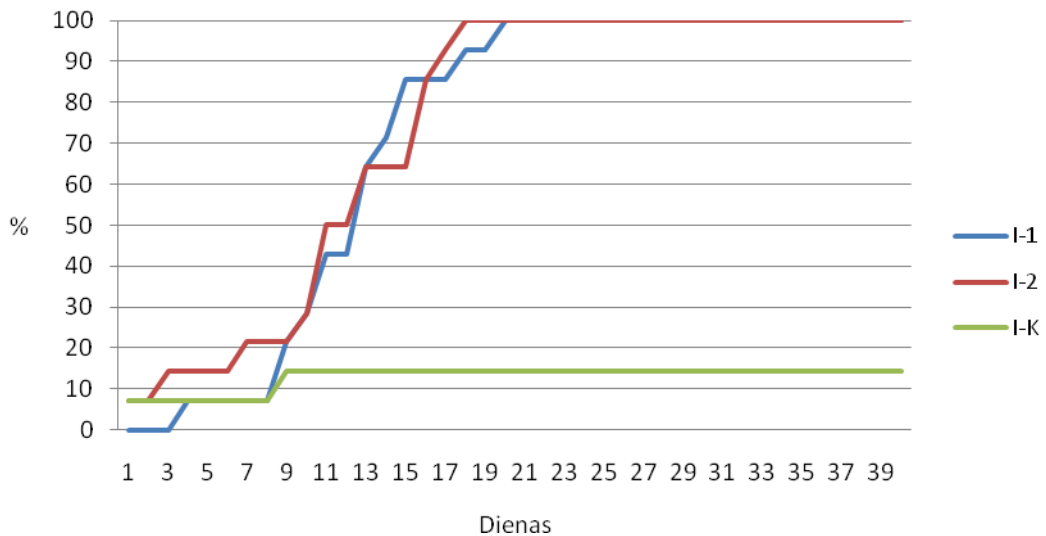
Analizējot literatūru, noskaidrojām, ka dažādās valstīs no spurām ir izolētas *P. fluorescens*, *P. anquilliseptica* u.c. (El Altara et al., 1996; Khan et al., 1981), *A. salmonicidae* (Turnbull, 1993) *Vibrio spp.* (Khan et al., 1981). Mūsu pētījumā visbiežāk atrastas *A.hydrophila* un *Flavobacterium spp.*. *A. hydrophila* ir visbiežāk ūdens sedimentā atrastā baktērija (Mateos et al., 1992), bet *Flavobacterium spp.* Latvijas apstākļos lašiem biežāk sastopamā infekcijas izraisītāja. Tādēļ loģiska ir šo baktēriju kombinācija arī uz spurām. Kombināciju: *A.hydrophila* un *A. salmonicidae* diagnosticējām 7 gadījumos, bet neidentificētas *Flavobacterium* ģints baktērijas un *A. salmonicidae* 6 gadījumos.

Lai pierādītu spuru nekrozes etioloģiju, eksperimentā izmantotos lašu mazulus inficēja ar izolēto baktēriju tūrkultūru. Monoinfekcijai izmantoja *Aeromonas hydrophila* un *A. salmonicidae*. Pēc zivju inficēšanas katru dienu novēroja zivis, mirušajām zivīm veica bakterioloģisko analīzi.

Otrā dienā pēc zivju inficēšanas vēdera dobumā, ap injekcijas vietu parādījās iekaisuma pazīmes. Inficējot vēdera dobumā ar *A. salmonicidae* pirmā zivs nomira jau nākamajā dienā pēc injekcijas, bet *A. hydrophila* gadījumā 4. dienā. Straujāka zivju mirstība bija inficējot *A. salmonicidae*, nedaudz lēnāk slimības attīstības process

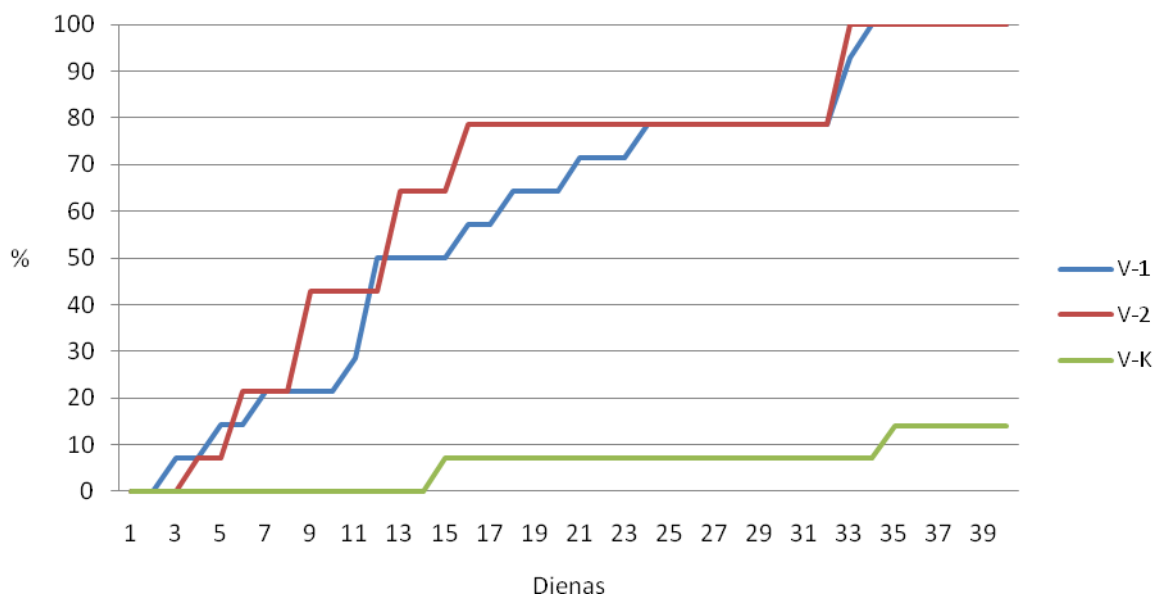
noritēja inficējot ar *A. hydrophila* un kumulatīvā mirstība sasniedza 100% attiecīgi 18. un 20. dienā pēc inficēšanas (2. att.).

Lašiem, kuri tika inficēti vēdera dobumā spuru nekroze neattīstījās. Veicot ihtiopatoloģisko izmeklēšanu, noskaidrojām, ka visām mirušajām zivīm vēdera dobumā bija sarkans šķidrums, serozajās plēvēs skaidri redzams asinsvadu zīmējums. Pēc 10 dienas mirušajiem lašiem palielināta liesa, ar noapaļotām malām, muskulatūra sarkanīga. Kontroles grupā līdz piektajai dienai bija mirusi viena zivs, kurai nekādas redzamas patoloģiskās izmaiņas nesaskatījām. Otrā kontroles grupas zivs nomira 9. dienā un arī bez redzamām patoloģiskām izmaiņām.



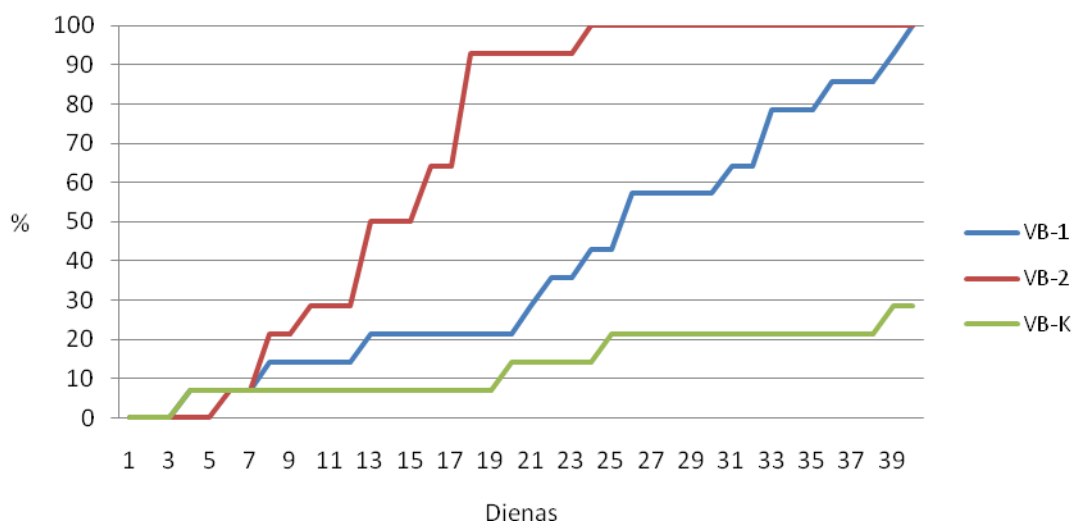
2.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc baktēriju suspensijas injekcijas vēdera dobumā**  
 Figure 2. **Cumulative mortality after intraabdominal injection of suspension of bacteria**

Vannojot lašus baktēriju suspensijā (2. pētījumu grupa) infekcijas ceļš ir gremošanas trakts un žaunas. Mirstība zivju grupā, kuras vannotas *A. salmonicidae* suspensijā pieauga no 9. līdz 16. dienai (3.att). Šajā periodā nomira 50 % zivju, kumulatīvā mirstība 100% atzīmi sasniedza 34. eksperimenta dienā. Mirušajām zivīm novēroja asinsiplūdumus muskulatūrā un uz serozajām plēvēm, dažām zivīm bija redzami asinsizplūdumi žaunās. Spuru nekrozes pazīmes šajā eksperimenta grupā nenovērojām.



3.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc zivju vannošanas baktēriju suspensijā**  
 Figure 3. **Cumulative mortality after fish bathing in suspension of bacteria**

Trešās eksperimenta grupas lašiem, pirms ievietošanas baktēriju suspensijā, veica iegriezumu, (radīja brūci) muguras spurā. Brūci pēc šīs ķirurģiskās manipulācijas neapstrādāja ar dezinficējošu šķīdumu, lai imitētu brūču rašanos baseinā (4. att).



4.attēls. **Kumulatīvā mirstība pēc mākslīgās brūces radīšanas un zivju vannošanas baktēriju suspensijā**  
 Figure 4. **Cumulative mortality after fin incision and fish bathing in suspension of bacteria**

Spuru nekrozes klīniskās pazīmes novēroja tikai tajās eksperimenta grupās, kurām veicām iegriezumu spurā. Klīniskās spuru nekrozes pazīmes sāka veidoties no 6. dienā

pēc vannošanas baktēriju emulsijā. Sākumā traumētajā vietā sāka veidoties iekaisums: apsārtums, bet 2-3 dienas vēlāk (8-9. dienā) jau labi saskatāms aplikums. Spuru nekroze attīstījās tikai VB-1 un VB-2 grupā.

Pēc zivju inficēšanas jau pirmajā diennaktī nomira divas zivis, viena I-2 un viena I-K grupā. Kopumā visātrāk 100% kumulatīvo mirstību sasniedza I-2 grupa- 18. dienā, bet I-1 20. dienā pēc inficēšanas, turpretī, zivis vannojot baktēriju suspensijā, 100 % kumulatīvā mirstība V-2 un V-1 grupā iestājās attiecīgi tikai 33. un 34. dienā.

Salīdzinot zivju kumulatīvo mirstību visās eksperimenta grupās, novērojām, ka zivis, kuras inficētas, injicējot vēdera dobumā baktēriju *A. hydrophila* suspensiju, nomira ātrāk nekā zivis, kuras vannotas suspensijā. Salīdzinot divus vannošanas veidus, noskaidrojām, ka vēlāk kumulatīvo mirstību sasniedza tā zivju grupa, kurai radījām brūci muguras spurā pirms vannošanas baktēriju *A. hydrophila* suspensijā.

Nedaudz atšķirīga situācija veidojās eksperimenta grupās, kurās inficēšanai izmantota *A. salmonicidae*. Tāpat kā iepriekšējā gadījumā, visātrāk kumulatīvo mirstību 100 % sasniedza eksperimentālā grupa, kurai vēdera dobumā injicēta baktēriju suspensija. Bet salīdzinot abas grupas, kurās izmantojām zivju vannošanu baktēriju suspensijā, pirmā kumulatīvo mirstību 100 % sasniedza zivju grupa, kurai radījām brūci muguras spurā pirms vannošanas baktēriju *A. salmonicidae* suspensijā.

Visas mirušās zivis atlasīja un veica bakterioloģisko izmeklēšanu. 1. un 2. pētījumā zivīm no spurām patogēnās baktērijas neizdalīja, taču I-1 un I-2 grupā no žaunām un iekšējiem orgāniem izolējām attiecīgi *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*. Kontroles grupas zivīm patogēnās baktērijas neizolēja.

Toties trešajā pētījumu sērijā, kur zivis inficēja veicot iegriezumu spurās, no spurām izolējām patogēnās baktērijas attiecīgi *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*. Visos gadījumos novēroja monoinfekciju.

Inficējot mencas (*Gadus morhua* L.) ar atipisko *A. salmonicidae* Magnodottir et al (2002) pielietoja intramuskulārās un intraperitoneālās inficēšanas metodes. Mortalitāti un klīniskās pazīmes pētīja 28 dienas. Zivju mirstība LD<sub>50</sub>. zivīm pēc intramuskulārās injicēšanas visām zivīm parādījās klīniskās pazīmes un no visām mirušajām izolēja *A. salmonicidae*. Toties pēc intraperitoneālās injekcijas ne no visām zivīm izolēja *A. salmonicidae*, pat gadījumos, kad bija redzamas slimības pazīmes. Ar *A. salmonicidae* eksperimentāli inficētas mencas (*Gadus morhua*) pēc intraperitoneālās inficēšanas ar *A. salmonicidae* 20 zivis no 49 mira pirmajās 15 dienās, pie kam viena zivs bija no kontroles grupas.

## SECINĀJUMI

1. Pētījumā konstatēts, ka lašu mazuļu spuru nekrozes gadījumā no skartajiem audiem ir izolētas *Flavobacterium*., *Aeromonas* un *Pseudomonas ginšu* baktērijas.
2. Uz lašu mazuļu spurām atrastas divas *Aeromonas spp.* sugas: *A. hydrophila* un *A. salmonicidae*.
3. Eksperimentāli pierādīts, ka primārais spuru nekrozes cēlonis ir traumatisms un sekundāri pievienojusies mikroflora. Ir izdevies izsaukt spuru nekrozi inficējot zivis ar vannošanas metodi baktēriju suspensijā pēc mākslīgi radītās traumas.

## LITERATŪRA

1. Atallah, O.A., Easa, M.E., Aly, A.A., Diab, A.S., Sakr, S.F. Pathological changes associated with the fin-rot-inducing bacterial diseases in fresh-water fish - *Alexandria-Journal-of-Veterinary-Science* (Egypt). 2008; 13(6): 629-644.
2. Bangaramma, Y., Rao, L.M., Lakshmi, B.B. Frequency of occurrence of external diseases in mullets from polluted waters of Visakhapatnam harbor - *Journal-of-Environmental-Biology*. 20.1: 25-27
3. Hazen, T.C., Fliermans C.B., Hirsch, R.P., Esch, G.W., Prevalence and Distribution of *Aeromonas* spp. In the United States. - *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; 36: 731-739.
4. Holm, J.C., Mono- and duo culture of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Arctic char (*Salvenius alpinus*) – *Canadian Journal Fisheries aquatic science* 1988; 46 (4): 697-704.
5. Kawula, T.H., Lelivelt. M.J., Orndorff, P.E., Using a new inbred fish model and cultured fish tissue cells to study *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri* pathogenesis. *Microbiology and Pathology*.1996; 20(2):119-125.
6. Khan, R.A., Campbell. J., Lear. H., Mortality in captive Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with fin rot disease.- *J Wildl Dis.* 1981; 17(4):521-7
7. Kirubaharan, J.J., Ravaneswaran, K., William, B.J., Balachandran, S., Studies on tail and fin - rot (*Bacterioses pinnarum*) disease in common carps (*Cyprinus carpio*). *Cheiron*. 1995; 24: 1: 31-34
8. Lang, T., Mellergaard, S., Wosniok, W., Kadakas, V., Neumann, K., Spatial distribution of grossly visible diseases and parasites in flounder (*Platichthys flesus*) from the Baltic Sea: a synoptic survey. *ICES Journal of Marine Science* 1999; 56: 138-147.
9. Lakshmanaperumalsamy, P., Chandramohan, D., Natarajan, R., Fin rot and other diseases in marine fishes. *Proceedings-of-the-Indian-Academy-of-Sciences,-Animal-Sciences*. 1984; 93: 2: 107-114.
10. Mateos, D., Anguita, J., Rivero, O., Naharro, G., Paniagua, C., Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water and sediments of a river. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1992;193(2):114-122
11. Moutou, K.A., McCarthy, I.D., Houlihan, D.F., The effect of ration level and social rank on the development of fin damage in juvenile rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 1998; 52: 756-770.
12. Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Dis Aquat Organ*. 2001; 22; 46(1): 23-29.
13. Noble, A.C., Summerfelt, S.T., Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual-Review-of-Fish-Diseases*. 1996. 6: 65-92
14. Kirubaharan, J.J., Ravaneswaran, K., William, B.J., Balachandran, S., Studies on tail and fin - rot (*Bacterioses pinnarum*) disease in common carps (*Cyprinus carpio*). *Cheiron*. 1995. 24: 1, 31-34.
15. Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J., Naharro, G., Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinic Microbiology*. 1990; 28(2): 350-355.



16. Piper, R. G., McElwain, I. B., Orme, L. E., McCraren, J. P., Fovler, L. G., Leonard, J. R. Fish Hatchery Management. In: Fish Hatchery Management. (ed.). Department of the Interior U S Fish and Wildfish service, Washington, 1982; 515.
17. Sechi, L.A., Deriu, A., Falchi, M.P., Fadda, G., Zanetti, S., Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *J Appl Microbiol* 2002; 92(2): 221-7.
18. Stoskopf, M.K., Fish medicine. In: *Fish medicine*. Anderson, D. P., Gatzek, J. B (eds.). W B Saunders Company, London, 1993; 880.
19. Turnbull, F., Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R., Bacterial gill disease and fin rot. *Bacterial-diseases-of-fish*. 1993; 40-57.
20. Van den Heuvel, M.R., Power, M., Richards, J., MacKinnon, M., Dixon., D.G., Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2000; 46(3):334-341.
21. Wiklund, T., Bylund, G. Fin abnormalities of pikeperch in coastal areas off the Finnish south coast. *Journal of Fish Biology* 1995; 48: 652-657.

## SIERU MIKROFLORAS ANALĪZE

### ANALYSIS OF CHEESE MICROFLORA

**Alla Mikelsons, Inga Ciproviča**

LLU, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Food Technology, Latvia

[Inga.Ciprovica@llu.lv](mailto:Inga.Ciprovica@llu.lv)

#### ABSTRACT

Cheese microflora consists of starter, secondary and adventitious microorganisms. Adventitious microflora mostly are heterofermentative lactobacilli that originate from raw milk and factory environment. This flora opposite to starter cultures increase during ripening reaching  $10^8$  cfu  $g^{-1}$ , and contribute to the formation of typical desirable or atypical flavour and texture of product. The aim of the paper was to establish diversity and changes in dynamic of *Lactobacillus* spp. during ripening of Krievijas cheese. Three different Krievijas cheeses were chosen for further analysis. Strain identification and counting of colony forming units were made for unripened sample right away after salting, then after 15, 30, 45, and 60 days samples ripened at 6 °C and 12 °C. Serial dilutions of each cheese sample (1:10 000, 1:100 000, and 1 000 000) in saline were made. *Lactobacillus* was cultivated using MRS media. Strain identification was performed by the API 50 CHL system (BioMerieux, Marey l'Etoile, France). Analysis were accomplished for unripened sample then after 15, 30, 45 and 60 days of ripening. Isolates were grouped by gram reaction by the 3% KOH method and catalase reaction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method. Obtained results shown that all isolated *Lactobacillus* were Gram positive, catalase negative. Diversity of *Lactobacillus* indicated prevalence of *Lactobacillus curvatus* in Krievijas cheese. Moreover *Lactobacillus plantarum* 1, *L.delbrueckii* ssp. *lactis* 1, *L. acidophilus* 3, *Leuconostoc lactis* were isolated from Krievijas cheese samples. *Lactobacillus plantarum* 1 was isolated only from samples ripened at 12°C. Concentration of colony forming units after 60 days of ripening is higher in cheese ripened at 6°C.

**KEY WORDS:** cheese, API, *Lactobacillus* spp., ripening condition.

#### IEVADS

Sieru mikroflora ir ļoti daudzveidīga, tās sastāvā ietilpst pienskābes baktēriju ieraugi, sekundārā un netipiskā mikroflora. Ieraugu un sekundāro mikrofloru pievieno pienam, lai attiecīgajai siera šķirnei nodrošinātu garšas, smaržas un konsistences īpašības. Savukārt netipiskā mikroflora nonāk produktā ar izejvielu un tālāk jebkurā pārstrādes procesā, sieram saskaroties ar gaisu, tehnoloģiskajām iekārtām, sālījumu, u.c., būtiski ietekmējot tā kvalitāti. Siera mikrofloras raksturīgākie pārstāvji apkopoti 1.tabulā.

**Siera mikrofloras raksturīgākie pārstāvji**  
**Typical representatives of cheese microflora (Stiles, Holzappel, 1997)**

Ierauga mikroflora	Sekundārā mikroflora	Netipiskā mikroflora
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>shermanii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Penicillium camamberti</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Pencillium roqueforti</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Candida valida</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		<i>Pediococcus spp.</i>

Mikrofloras daudzveidība un attīstības intensitāte sieros ir atkarīga no ūdens aktivitātes ( $a_w$ ), sāls satura, pH, nogatavināšanas temperatūras, red-oks potenciāla un nitrātu/nitrītu satura. Ierauga mikrofloras dzīvotspēju sieros nosaka laktozes saturs, līdz ar tās pārraudzēšanu samazinās ierauga sastāvā esošo *Lactococcus spp.* un *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus spp.*, u.c. pienskābes baktēriju dzīvotspēja un paātrinās šūnu atmiršanas process. Sieru mikroflorā dominējošās kļūst netipiskās pienskābes baktērijas. Netipisko pienskābes baktēriju koncentrācija no  $10^2$  KVV  $g^{-1}$  nogatavināšanas sākumā sasniedz  $10^{8-9}$  KVV  $g^{-1}$  pāris nedēļu laikā (Fox et al., 1998).

Lai gan netipiskās pienskābes baktērijas ir homofermentatīvas, fakultatīvi heterofermentatīvas un obligāti heterofermentatīvas, dominējošie netipisko pienskābes baktēriju pārstāvji sieros pieder pie fakultatīvi heterofermentatīvajiem. Tie laktozi pārraudzē glikolītiskā ceļā, bet glikonskābi utilizē fruktozes 6-fosfoketolāzes ceļā. Visbiežāk no sieriem izolē *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* un *L.curvatus* (Coppola et al., 1997, Fitzsimons et al., 1999). Sugu pārstāvniecība mainās nogatavināšanas laikā. Jaunos sieros dominē *L.paracasei*, *L.plantarum* un *L.brevis*, bet nogatavinātos *L.paracasei*, u.c.

Analizējot mazumtirdzniecībā iegādājamus Latvijas uzņēmumos ražotos Krievijas sierus, tajos noteikts *L.curvatus* vai *L.curvatus* un *L.plantarum*, vai *L.curvatus* un *L.acidophilus* asociācijas (Miķelsone, Ciproviča, 2009). Katram sieram ir sava raksturīgā mikroflora, pat vienas šķirnes dažādu ražotāju sieriem mikrofloras sastāvs varbūt atšķirīgs.

Zinātniskajā literatūrā diskusijas par mezofilo pienskābes baktēriju, pie kurām pieder gan ierauga, gan netipiskās, augšanas dinamiku un sasaisti ar laktozes saturu sierā tiek nepārtraukti turpinātas. Kā minēts iepriekš, nogatavināšanas sākumā (līdz 15. dienai) laktozi pilnībā pārraudzē ierauga mikroflora (Turner, Thomas, 1980). Samazinoties laktozes saturam, ierauga mikroorganismi pamazām atmirst, tajā pat laikā mezofīlie netipisko pienskābes baktēriju pārstāvji turpina vairoties. Tas nozīmē, ka sierā ir citi šo mikroorganismu augšanai pieejamie substrāti. Netipisko pienskābes baktēriju enerģijas avoti ir no glikomakropeptīdiem atvasināti cukuri un tauku lodīšu apvalkos esošie glikoproteīni (Fox et al., 1998; Williams et al., 2000). Arī riboze, kas atbrīvojas ierauga šūnu atmiršanas rezultātā, ir jāuzskata par netipiskās mikrofloras enerģijas avotu (Thomas, 1987; Rapposch et al., 1999). Citi autori (Lane et al., 1997) uzskata, ka šūnu lizāts nav galvenais netipiskās mikrofloras barības avots un ir apstiprinājumi, ka tā nemaz nav spējīga utilizēt ribozi. Pie citiem sierā esošajiem netipisko pienskābes baktēriju augšanas substrātiem tiek minēti citrāti un arginīns. Vērojot daudzveidīgo

netipisko pienskābes baktēriju pārstāvniecību sieros, to augšanai piemērotos apstākļus un barības vielu pieejamību, jautājums par to lomu sieru kvalitātes veidošanā aktuāls ir katram sieru ražotājam. Tāpēc vienīgais veids kā nodrošināt sieru kvalitāti, ir apzināt sieru mikrofloras raksturīgākos pārstāvjus, to mainību nogatavināšanas laikā un analizēt proteolīzes, lipolīzes un glikolīzes produktus, saistot ar sieru sensorajām īpašībām. Līdz ar to pētnieciskā darba mērķis bija noskaidrot Krievijas siera mikrofloras mainību nogatavināšanas laikā.

## MATERIĀLS UN METODE

Pētījumiem izvēlēti Latvijā ražotie Krievijas siera paraugi ar 2.tabulā dotajiem kvalitātes rādītājiem.

2.tabula/Table 2

### Analizēto sieru kvalitātes rādītāji Quality parameters of analysed cheese

Siers Cheese	Tauku saturs sausnā, % Fat in dry matter, %	Ūdens saturs, % Moisture content, %	Sāls saturs, % Salt content, %	<i>E.coli</i> , KVV g <sup>-1</sup> <i>E.coli</i> , CFU g <sup>-1</sup> *
Krievijas siers I / Krievijas cheese I	50±3	40-44	1.0-1.6	m≤100 M<1000 KVV g <sup>-1</sup> n=5, c=2
Krievijas siers II / Krievijas cheese II	50±2	≤43	≤1.8	
Krievijas siers III / Krievijas cheese III**	50±3	40-44	1.0-1.6	

\*- *Eiropas Padomes un Parlamenta Regula 2073/2005*

\*\*- *ierauga sastāvs papildināts ar pienskābes baktēriju sugām (Lactococcus lactis subsp.lactis, Lactococcus lactis subsp.cremoris), kurām ir lielāka lipolītiskā un proteolītiskā aktivitāte*

Krievijas siers gatavots atbilstoši uzņēmumu normatīvi-tehniskajā dokumentācijā noteiktajām prasībām. Pētījumiem izmantoti 3 nenogatavināta siera paraugi. Siera paraugi laboratorijā nogādāti tajā pašā dienā, kad izņemti no sālījuma un apžāvēti. Saņemtie paraugi analizēti uzreiz un tālāk pārvietoti nogatavināšanai, iepakojot polimēra materiāla plēvē. Siers nogatavināts LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras laboratorijās, izvēloties 2 nogatavināšanas režīmus 6°C un 12°C temperatūrā un 75-85% relatīvajā mitrumā. Nogatavināšanas temperatūras izvēlētas, pamatojoties uz normatīvi-tehniskajā dokumentācijā noteiktajiem parametriem, kā arī, lai modelētu iespējamās mikrofloras sastāva izmaiņas šajā laikā.

Paraugi analizēti nogatavināšanas sākumā un tālāk ik pēc 15 dienām 60 dienu laikā. Sieri nogatavināti 60 dienas, atbilstoši Krievijas sieru nogatavināšanas režīmu un ilguma rekomendācijām. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits noteikts, lietojot MRS barotni. Sagatavotie paraugi, šādās atšķaidījuma pakāpēs 1:10 000, 1: 100 000, 1:1 000 000, inkubēti 37°C 48 h. Izaugušās kolonijas mikroskopētas, ar mērķi izdalīt tīrkultūras veidošanai raksturīgākos pārstāvjus. Tīrkultūras pavairošana veikta 37°C 48 h.

Līdzās veiktajiem izmeklējumiem, veikts krāsojums pēc Grama, lietojot Gregersena metodi, un katalāzes tests ar 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Lactobacillus* ģints sugu identifikācija veikta, lietojot API 50 CHL testu (Bio Merieux, Mareyl'Etoile, Francija), pamatojoties uz fermentējamo substrātu krāsu reakcijām un to profilu analīzi. Sugas noteikšanai lietota API LAB plus version 4.0 (Bio Merieux) programma. Visas analīzes veiktas 3 atkārtojumos katrai atšķaidījumu sērijai.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Krievijas siera ražošanā tiek lietots mezofilo pienskābes baktēriju ieraugs (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*). Pamatojoties uz siera ražošanas īpatnībām, pievienojot vairāk ierauga, intensificējot pienskābo rūgšanu siera graudu apstrādes laikā un paildinot siera izturēšanu starp presēšanu un sālīšanu, laktoze tiek pārraudzēta 2-3 nogatavināšanas dienu laikā. Nogatavināšanas sākumā strauji sarūk ierauga pienskābes baktēriju koncentrācija, atbrīvojot ceļu netipisko pienskābes baktēriju vairošanai. Netipisko pienskābes baktēriju kvantitāte, augšanas ātrums un sugu daudzveidība ir atkarīga gan no piena mikrofloras, tehnoloģiskā procesa režīmiem un nogatavināšanas apstākļiem siera ražošanā. 3. un 4.tabulā ir apkopotas no Krievijas sieriem izdalītās pienskābes baktēriju sugas.

3.tabula/Table 3

### Krievijas siera paraugu mikrofloras analīze, nogatavinot to 60C temperatūrā Microflora analysis of Krievijas cheese ripened at 60C

Nogatavināšanas ilgums, dienas Ripening time, days	Krievijas siers I Krievijas cheese I	Krievijas siers II Krievijas cheese II	Krievijas siers III Krievijas cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
15 dienas / 15 days	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp.lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>delbrueckii</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
30 dienas / 30 days	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i>
45 dienas / 45 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i>
60 dienas / 60 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>

**Krievijas siera paraugu mikrofloras analīze, nogatavinot to 12oC temperatūrā**  
**Microflora analysis of Krievijas cheese ripened at 12oC**

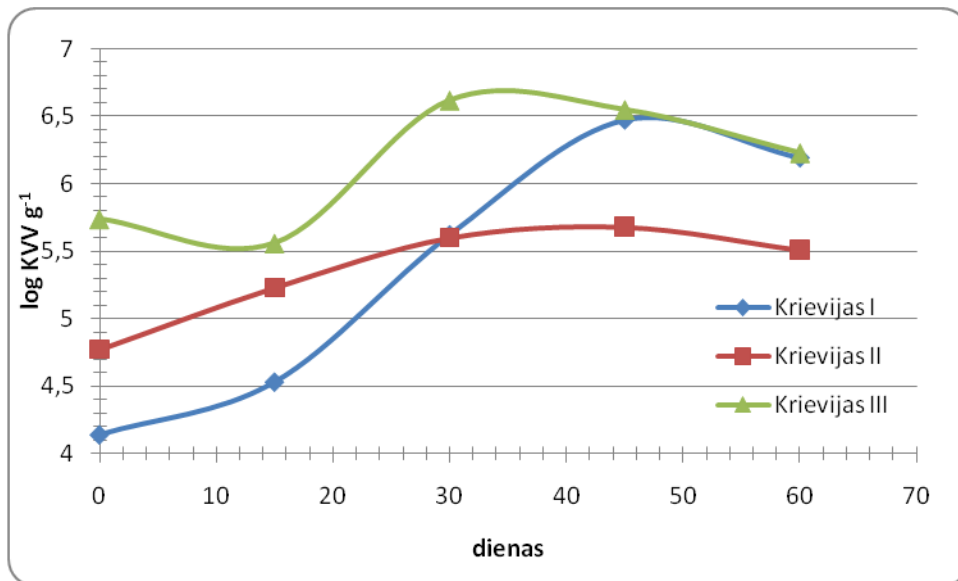
Nogatavināšanas ilgums, dienas Ripening time, days	Krievijas siers I Krievijas cheese I	Krievijas siers II Krievijas cheese II	Krievijas siers III Krievijas cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp.lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
15 dienas / 15 days	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
30 dienas / 30 days			<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>delbrueckii</i>
45 dienas / 45 days		<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Leuconostoc lactis</i>
60 dienas / 60 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	

Analizētajos paraugos ir novērota pienskābes baktēriju sugu mainība, piemēram, Krievijas sieros I un II līdz 30 dienām, nogatavinot tos 6°C temperatūrā, un līdz 15 dienām, nogatavinot 12°C temperatūrā. Pēc minētā nogatavināšanas laika sieros dominēja *Lactobacillus curvatus* un *Lactobacillus plantarum 1*. Tas sasaucas ar Fitzsimons un līdzautoru (2001) un Williams un līdzautoru (2002) pētījumu atziņām, ka nogatavināšanas laikā novērojama netipisko pienskābes baktēriju sugu mainība, bet sieros nogatavināšanas beigās ir pārstāvēta tikai viena *Lactobacillus* ģints suga.

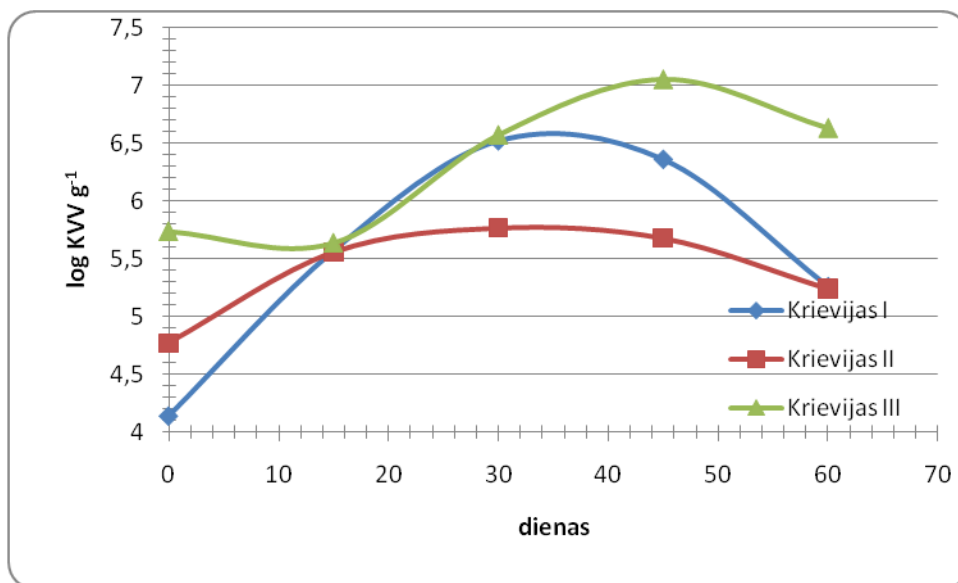
Atšķirīga situācija vērojama Krievijas siera III analīzē, nogatavinot paraugus 6°C. Redzam, ka *Leuconostoc lactis* pamazām izkonkurē *Lactobacillus acidophilus 3* un *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis 1*. Sugu daudzveidību šajā sierā ir jāskaidro ar izmainīto ieraugu sastāvu un īpašībām, jo šī produkta ražošanā lietotajam ieraugam sastāvs ir papildināts ar pienskābes baktēriju sugām, kurām ir lielāka proteolītiskā un lipolītiskā aktivitāte.

Arī 12°C temperatūrā nogatavinot Krievijas siera III paraugus, var novērot, ka *Leuconostoc lactis* saglabā savu dzīvotspēju visu sieru nogatavināšanas laiku, bet konkurencē par pastāvēšanu *Lactobacillus acidophilus 3*, *Lactobacillus brevis* un *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* zaudē pozīcijas, ļaujot nostiprināties *Lactobacillus curvatus* domināncei.

Sugu mainību (3.4. tabula) un mikrofloras kvantitāti raksturo pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dati, kas apkopoti 1. un 2.attēlā.



1.attēls. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo baktēriju skaita izmaiņu dinamika, nogatavinot sierus 6°C temperatūrā  
 Figure 1. The dynamic of colony forming units changes in cheese ripened at 6°C



2.attēls. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo baktēriju skaita izmaiņu dinamika, nogatavinot sierus 12°C temperatūrā  
 Figure 2. The dynamic of colony forming units changes in cheese ripened at 12°C

Nogatavinot Krievijas sieru 6°C temperatūrā, *Lactobacillus ssp.* maksimālo koloniju veidojošo vienību skaitu sasniedza ap 45.dienu, izņemot Krievijas sieru III, kurā pienskābes baktēriju maksimālā koncentrācija tiek sasniegta ap 30.dienu. 12°C nogatavinātajā Krievijas sierā I un II *Lactobacillus ssp.* augstāko skaitu sasniedz ap 30.nogatavināšanas dienu, bet Krievijas sierā III pienskābes baktēriju intensīva augšana turpinājās līdz 45.dienai. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita izmaiņas paraugos parāda, ka to pieaugums ir atkarīgs no nogatavināšanas temperatūras (Folkertsma et al., 1996), ierauga sastāva un tā īpašībām.

## SECINĀJUMI

1. Analizētajos Krievijas sieru I, II un III paraugos nogatavināšanas beigās ir novērojama tendence dominēt vienai no *Lactobacillus* ģints sugām.
2. Sieru mikrofloras sastāvs ir atkarīgs no nogatavināšanas temperatūras.
3. Ierauga sastāvs un pilnveidotās tā funkcijas sieru mikrofloras kvalitatīvo sastāvu būtiski ( $p \leq 0.05$ ) ietekmēt nespēj.

## LITERATŪRA

1. Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Grazia, L. Survey of lactic acid bacteria during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggano cheese. - Journal of Dairy Research. 1997; 64: 305-310.
2. Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic bacteria in mature Cheddar cheese. - Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65: 3418-3426.
3. Folkertsma, B., Fox, P.E., McSweeney, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. - International Dairy Journal. 1996; 6:1117-1134.
4. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Lynch, C.M. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. - Australian Journal of Dairy Technology. 1998; 53: 83-89.
5. Lane, C.N., Fox, P.F., Walsh, E.M., Folkertsma, B., McSweeney, P.L.H. Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. - Lait. 1997; 77: 561-573.
6. Miķelsons, A., Ciproviča, I. Diversity of non starter lactic acid bacteria in Latvian semi hard cheeses. - Annual 15th International Scientific Conference Proceedings „Research for rural development 2009”. 2009; 15: 103-107.
7. Rapposch, S., Eliskases-Lechner, F., Ginzing W. Growth of facultatively heterofermentative lactobacilli on starter cell suspensions. - Applied Environmental Microbiology. 1999; 65: 5597-5599.
8. Stiles, M.E., Holzappel, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. - International Journal of Food Microbiology. 1997; 36: 1-29.
9. Thomas, T.D. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. - New Zealand Journal of Dairy Science and Technology. 1987; 22: 25- 38.
10. Turner, K.W., Thomas, T.D. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. - New Zealand Journal of Dairy Science and Technology. 1980; 15: 265-276.
11. Williams, A.G., Withers, S.E., Banks, J.M. Energy source of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. - International Dairy Journal. 2000; 10: 17-23.



# RAPŠA RAUŠU IZMANTOŠANAS EKONOMISKIE UN EKOLOĢISKIE FAKTORI STALTBRIEŽU ĒDINĀŠANĀ

## RAPESEED OIL CAKE USING ECONOMICAL AND ECOLOGICAL FACTORS IN RED DEER FEEDING

**Līga Proškina, Aleksandrs Jemeljanovs, Īra Irēna Vītiņa, Vera Krastiņa, Biruta Lujāne, Imants Jansons**

LLU, Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvia  
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “Sigra”, Latvia  
[sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

### ABSTRACT

The rapeseed oil cake economical and environmental factors were evaluated by its using in red deer (*Cervus elaphus*) feeding, replacing the equivalent feed value of feed stock used in traditional rolled grain ration used during the winter period.

We concluded that 0.2 kg dose in ratio of rapeseed oil cake per day in average for one red deer increased lean meat percentage of carcass by 4.43%, reduced the amount of consumed feed and expenses correspondingly by 3.2% and 8.13% increased feed crude protein utilization in animals organism by 6.18% in comparison with the control group. Environmental pollution with undigested protein in excreted manure decreased by 15.02% and expenses decreased by 20.30% in comparison with the control group.

**KEY WORDS:** red deer, rapeseed oilcake, economic, ecology.

### IEVADS

Ilgspējīgas briezķkopības nozares attīstību nosaka agro-ekoloģisko, sociālo un ekonomisko faktoru kopums (Fraser et al., 2007; Paulesich, et al., 2007). Nozares pamatuzdevums mūsu valstī ir ražot maksimālā daudzumā augstvērtīgu briezķu gaļu, ko nodrošina pilnvērtīga, ar proteīnu bagātinātas barības izēdināšana staltbriezķiem.

Ziemas periodā staltbriezķi tiek pakļauti klimata ietekmei, samazinās vielmaiņa. Pieaugušie dzīvnieki ziemā zaudē līdz 20% no ķermeņa svara (Fletcher, 1989; Tuckwell, 2003; Paeglītis et al., 2006). Lai saglabātu ķermeņa svaru ziemas periodā nepieciešama pilnvērtīga staltbriezķu ēdināšana, nodrošinot, lai 150 – 200 kg smags dzīvnieks atbilstoši normatīviem vidēji dienā saņemtu ar barības līdzekļiem 2.6 – 2.7 kg lielu sausas, 320.0-330.0 g lielu proteīna un 25.0-39.0 MJ lielu maiņas enerģijas daudzumu (Adam, 1994).

Latvijā staltbriezķiem šādu barības vērtību nodrošina izēdinot dienā vienam dzīvniekam vidēji ap 7 kg skābsienu un 1 kg placinātus graudus (auzas u.c.) (Paeglītis et al., 2006). Literatūrā pieejamā informācija liecina, ka ārvalstu briezķaudzētāji ziemas barību bagātina ar proteīnu saturošiem zivju miltiem (Adam, 1994; Tuckwel, 2003) Arī Latvijā pastāv iespēja ziemas periodā bagātināt staltbriezķu barības devu ar proteīnu saturošiem barības līdzekļiem, t.i. var izmantot rapša raušus. Rapša rauši raksturojas ar augstu barotāvērtību, to sastāvā vidēji dabīgā paraugā ir 35.0 – 45.0% kopproteīna, 14.0-15.0% koptauku, 7.27 MJ/kg maiņas enerģijas daudzums u.c. barības vielas.

Rapša rauši staltbriezķu barības devā var sekmīgi aizvietot attiecīgu graudu daudzumu un nodrošināt dzīvniekiem nepieciešamo kopproteīna daudzumu. Līdz šim nav veikti pētījumi un vispusīgi izvērtēta rapša raušu izmantošanas ekonomiskā un

ekoloģiskā efektivitāte staltbriežu ēdināšanā Latvijas apstākļos. Īpaši svarīgi ir izpētīt rapša raušos esošā kopproteīna sagremojamību un izmantojamību staltbriežu organismā. Izēdinātā barībā esošā kopproteīna sagremojamības un izmantojamības līmeni dzīvnieku gremošanas sistēmā būtiski raksturo arī nesagremotā un neizmantotā kopproteīna daudzums izdalītajos mēslos (Osītis, 2004). Izdalītais nesagremotā kopproteīna daudzums ķīmiski un bakterioloģiski noārdās un piesārņo apkārtējo vidi, vienlaicīgi rada ekoloģiskus un ekonomiskus zaudējumus sakarā ar barības nepilnvērtīgu izmantošanu. No ekonomiskā viedokļa nepieciešams izvērtēt rapša raušu izmantošanas izmaksas staltbriežu ēdināšanā salīdzinot ar tradicionāla sastāva barības līdzekļu izmantošanu. No ekoloģiskā viedokļa ir nepieciešams izvērtēt vai rapša raušu izēdināšana staltbriežiem negatīvi neietekmē apkārtējo vidi, t.i. nepalielina nesagremoto barības vielu izdali apkārtējā vidē. Tādēļ mūsu **pētījuma mērķis** bija izvērtēt rapša raušu izmantošanas ekonomisko un ekoloģisko efektivitāti staltbriežu ēdināšanā ziemas periodā.

## MATERIĀLS UN METODEDES

Rapša raušu ēdināšanas izmēģinājumu veica ar nebrīvē, iežogotās teritorijās audzētiem staltbriežiem (*Cervus elaphus*) 2010. gada ziemas periodā 3 mēnešus ilgi. Sniega segas biezums aplokos bija vidēji 53 cm, vidējā gaisa temperatūra - 5.6°C, kas faktiski bija 0.7 grādus zemāka par normu (Meteoroloģijas centrs, 2010). Dabas apstākļi nodrošināja, ka staltbrieži varēja uzņemt tikai tiem izēdināto barību. Ēdināšanas izmēģinājuma shēma norādīta 1. tabulā. Izmēģinājumā bija divas analoga vecuma staltbriežu grupas: 1. grupa – kontrole, 2. grupa – izmēģinājuma.

1. tabula/Table 1

**Staltbriežu ēdināšanas izmēģinājuma shēma**  
**The scheme of the deer feeding trial**

Rādītāji Parameters	Barības devas sastāvs 1 staltbriedim dienā Ration composition of one red deer per day	
	1. grupa – kontroles Group 1 - control	2. grupa – izmēģinājuma Group 2 - trial
Dzīvnieku skaits grupā / Number of animals	10	10
Barības līdzekļi / Feed stuffs:		
skābsiens, kg / haylage, kg	7	7
placināti graudi, kg / rolled grains, kg	1	0.550
rapša rauši, kg / rapeseed oil cake, kg	-	0.200

Kontroles un izmēģinājuma grupas staltbriežus ēdināja ar vienādas vērtības barību. Barības devas sastāvs bija sabalansēts atbilstoši gadalaikam un staltbriežu organisma fizioloģisko prasību normatīviem, lai viens dzīvnieks dienā varētu uzņemt 2.6 kg sausu, kas saturēja 320.7g kopproteīna. (Fletcher, 1989; Adam, 1994). Izmēģinājuma grupas viena staltbrieža dienas barības devā iekļāva 0.2 kg rapša raušus. Lai kontroles un izmēģinājuma grupas staltbriežu barības deva saturētu vienādu sausas, kopproteīna un citu barības vielu daudzumu, izmēģinājuma grupas staltbriežu barības devā attiecīgi par 0.450 kg samazināja placināto graudu daudzumu.

Izmēģinājuma periodā rapša raušu izmantošanas efektivitāti staltbriežu ēdināšanā izvērtēja ekoloģiskā un ekonomiskā aspektā. Rapša raušu saturošās barības devas ekonomiskās efektivitātes novērtēšanai izmēģinājuma perioda beigās noteica muskuļaudu, kaulaudu, taukaudu īpatsvaru kontroles un izmēģinājuma grupas staltbriežu liemenī, noteic barības patēriņu vienam dzīvniekam dienā, aprēķināja patērētās barības izmaksas un ieņēmumus par staltbriežu gaļas realizāciju.

Lai noteiktu ar rapša raušiem ēdinātu staltbriežu iespējamo ietekmi uz apkārtējo vidi, analizēja kopproteīna saturu staltbriežu mēšlos un aprēķināja nesagremotā kopproteīna izdalīto daudzumu un tā izmaksas diennaktī ar mēsliem.

Barības un mēslu bioķīmiskās analīzes veica LLU ZI Sigrā akreditētā bioķīmijas zinātniskā laboratorijā (LATAK reģ. Nr. LATAK-T-038-06-99-A) pēc standarta LVS EN ISO/IEC 17025-2005, visas analīzes veic pēc atbilstošiem akreditētiem ISO standartiem. Iegūtos datus apstrādāja ar *Microsoft Excel* datu matemātiskās apstrādes metodēm.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Rapša raušu izēdināšanas ietekmi uz staltbriežu produktivitāti izvērtēja pēc muskuļaudu, taukaudu un kaulaudu īpatsvara liemenī. Šo daļu īpatsvars bija atšķirīgs starp grupām (2.tabula).

2. tabula/Table 2

**Staltbriežu liemeņa daļu īpatsvars un attiecība**  
**An average components percentage and ratio of deer carcasses**

Grupa Group	Muskuļaudi,% Muscle tissue, %	Taukaudi, % Adipose tissue, %	Kaulaudi,% Bone tissue, %	Muskuļaudu un kaulaudu attiecība Ratio mass of muscle and bone tissues
1. grupa – kontrole/ Group 1 - control	62.80	3.34	33.86	1.85
2. grupa – izmēģinājuma / Group 2 - trial	67.23	5.66	27.11	2.48
+/- pret kontroli / +/- to control	+4.43	+2.32	-6.75	+0.63

Izēdinot rapša raušus saturošu barību staltbriežu liemenī bija par 4.43% un par 2.32% attiecīgi lielāks muskuļaudu un taukaudu īpatsvars, bet par 6.75% mazāks kaulaudu īpatsvars salīdzinot ar kontroles grupu. Pēc datu matemātiskās apstrādes, izmēģinājuma grupas staltbriežiem muskuļaudu īpatsvars bija būtiski lielāks ( $p < 0.01$ ). Līdz ar to muskuļaudu un kaulaudu īpatsvaru attiecība izmēģinājuma grupas staltbriežu liemenī bija labāka (2.48) – par 0.63 augstāka nekā kontroles grupā. Tātad rapša raušu izmantošana staltbriežu barības devu sastāvā sekmēja staltbriežu produktivitāti, palielināja pārtikai derīgo daļu – muskuļaudu un taukaudu daudzumu liemenī. (2.tabula)

Izēdinot staltbriežiem barības devu ar rapša raušiem, bija iespējams samazināt patērētās barības daudzumu. Attiecīgi arī samazinājās patērētās barības izmaksas viena staltbrieža ēdināšanai. (3.tabula).

**Barības un kopproteīna patēriņš un izmaksas vienam staltbriedim diennaktī**  
**Feed and protein consumption and costs per red deer per day**

Rādītāji Parameters	1. grupa – kontrole/ Group 1 - control		2. grupa – izmēģinājuma/ Group 2 - trial	
	daudzums amount	LVL*	daudzums amount	LVL*
Barības sastāvā / In feed ration:				
skābsiens, kg/ haylage, kg	7.00	0.126	7.00	0.126
placinātie graudi, kg / rolled grain, kg	1.00	0.120	0.550	0.066
rapša rauši, kg / rapeseed oil cake, kg	-	-	0.200	0.034
Kopā / Total	8.00	0.246	7.750	0.226
% pret kontroli / % to control	100	100	96.87	91.87
Kopproteīna saturs barības devā, g/ Protein content to fed out feed ration, g	320.7	0.148	320.7	0.136
% pret kontroli / % to control	100	100	100	91.89

\*Barības līdzekļu cenas ir aprēķinātas pēc LR CSP un LLKC cenu apkopojuma par 2009. gadu.

Barības patēriņš vienam izmēģinājuma grupas staltbriedim dienā bija 7.750 kg, t.i. par 0.250 kg vai par 3.2% mazāks nekā barības patēriņš kontroles grupas staltbriedim diennaktī.

Patērētās barības izmaksas izmēģinājuma periodā vienam izmēģinājumā grupas staltbriedim izēdinot rapša raušus bija par 8.13% zemākas nekā barības patēriņa izmaksas kontroles grupā. Patērētās barības izmaksu starpību noteica kopproteīna daudzuma un izmaksu atšķirība placinātos graudos un rapša raušos.

Izēdinātā barībā esošā kopproteīna sagremojamības un izmantojamības līmeni dzīvnieku gremošanas sistēmā būtiski raksturo arī nesagremotā un neizmantotā kopproteīna daudzums izdalītajos mēslos (Osītis, 2004).

Ar mēsliem izdalītais nesagremotais kopproteīns, kopslāpekļis un fosfors ir galvenie lauksaimniecības dzīvnieku radītie apkārtējās vides ķīmiskie piesārņotāji (Nahm, 2004, Patterson, 1998). Atgremotājdzīvnieki, tajā skaitā staltbrieži, fosforu galvenokārt izdala no organisma ar urīnu (Aron A. Bondi, 1992).

Izēdinot rapša raušus, izmēģinājuma grupas staltbriežu organismā ziemas periodā tika izmantots 75.23% no barībā esošā kopproteīna daudzuma, t.i. par 4.38% vairāk nekā izmantotais kopproteīna daudzums no kontroles grupas barības sastāva (4.tabula).

**Kopproteīna daudzums staltbriežu barībā un mēslos un tā izmaksas  
(vienam briedim diennaktī)  
Crude protein amount and expenses in red deer feed and manure  
(for one deer per day)**

Rādītāji / Parameters	1. grupa – kontrole Group 1 - control	2. grupa – izmēģinājuma Group 2 - trial	+/- pret kontroli +/-_to control
Kopproteīns uzņemts ar barības sausu, g / Crude protein taken up by dry matter, g	320.7	320.7	-
Izdalīto mēslu daudzums diennaktī, sausa g / Excreten amount of manure per day, dry matter g	650.0	650.0	-
Kopproteīna saturs izdalīto mēslu daudzumā, g / Crude protein content in the excreted manure, g	93.47	79.43	- 14.04
% pret kontroles grupu / % to control group	100	84.98	- 15.02
Organismā izmantotais kopproteīna daudzums, g / Utilized crude protein, g	227.23	241.27	+ 14.04
% pret kontroles grupu / % to control group	100	106.18	+ 6.18
Izmantotā kopproteīna daudzums organismā no uzņemtā, % / Utilized crude protein from taken up in organism, %	70.85	75.23	+ 4.38
Uzņemtā kopproteīna izmaksas, LVL / Expenses of taken up crude protein, LVL	0.148	0.136	- 0.012
Izdalītā kopproteīna izmaksas, LVL / Expenses of excreted crude protein, LVL	0.043	0.034	- 0.009
Izdalītā kopproteīna izmaksas % pret kontroli / Expenses of excreted crude protein to control, %	100	79.07	- 20.30

Šie dati norāda, ka, izmantojot staltbriežu ēdināšanā rapša raušus, kopproteīna un kopslāpekļa sagremojamība un izmantojamība bija salīdzinoši augstākā līmenī nekā kontroles grupā. Rezultātā samazinājās vides piesārņojums ar staltbriežu ekskretēto kopproteīna un kopslāpekļa daudzumu. Izmēģinājuma grupas staltbrieži apkārtējā vidē ar mēsliem izdalīja par 15.02% mazāk nesagremoto kopproteīnu nekā kontroles grupas staltbrieži, t.i. samazinājās apkārtējās vides piesārņojums.

Nesagremotais un no organisma ar mēsliem izdalītais kopproteīns ķīmiski un bakterioloģiski noārdoties no vienas puses ir apkārtējās vides piesārņotājs, bet no otras puses tas rada ekonomiskus zaudējumus, nepilnvērtīgas barības izmantojamības dēļ. Vērtējot naudas izteiksmē, izēdinot staltbriežiem rapša raušus, nesagremotā un izdalītā kopproteīna izmaksas samazinājās par 20.30% salīdzinot ar kontroles grupu (4.tabula).

**Vides piesārņotāja – staltbriežu nesagremotā kopproteīna izmaksas  
(vidēji uz 100 briežiem diennaktī)  
Environmet pollution – deer undigested crude protein expenses  
(in average for 100 deer per day)**

Rādītāji Parameters	1. grupa – kontrole Group 1 - control	2. grupa – izmēģinājuma Group 2 - trial	+/- pret kontroli +/-_to control
Patērētās barības izmaksas, LVL / The utilised feed costs, LVL	24.60	22.60	-2.00
Nesagremotā kopproteīna izmaksas, LVL / The undigested crude protein costs, LVL	4.30	3.40	- 0.90
Nesagremotā kopproteīna izmaksu īpatsvars no kopējām patērētās barības izmaksām, % / The undigested crude protein expenses from total utilized feed expenses,%	17.48	15.04	- 2.44

Izmantojot staltbriežu ēdināšanā rapša raušus, samazinājās kopējās barības patēriņa izmaksas par 8.13% (3.tabula) un ekonomiski efektīvāk tika izmantots barībā, tajā skaitā rapša raušos, esošais kopproteīns, nesagremotā un ar mēsliem izdalītā kopproteīna izmaksas izmēģinājuma grupā bija par 0.90LVL zemākas nekā kontroles grupā, t.i. barībā esošā kopproteīna zudumi samazinājās par 2.44% rēķinot no kopējām patērētās barības izmaksām un vienlaicīgi samazinājās apkārtējās vides piesārņojums (5.tabula).

### SECINĀJUMI

- Izmēģinājuma apstākļos izvērtēja rapša raušu izmantošanas ekonomisko un ekoloģisko efektivitāti staltbriežu (*Cervus elaphus*) ēdināšanā ziemas periodā, iekļaujot 0.2 kg lielu rapša raušu devu vienam staltbriedim dienā. Salīdzinot ar kontroles grupu:
  - palielinājās muskuļaudu īpatsvars staltbriežu liemenī par 4.43%;
  - samazinājās patērētās barības daudzums un izmaksas attiecīgi par 3.2% par 8.13%;
  - palielinājās organismā izmantotais kopproteīna daudzums par 6.18%;
  - samazinājās apkārtējās vides piesārņojums ar ekskretētajos mēslos esošā nesagremotā kopproteīna daudzumu diennaktī par 15.02%;
  - samazinājās izdalītā nesagremotā kopproteīna izmaksas par 20.30%.
- Rapša raušu izēdināšana staltbriežiem palielina dzīvnieku produktivitāti – pārtikai derīgo daļu – muskuļaudu un taukaudu daudzumu liemenī un samazina apkārtējā vidē izdalītā nesagremotā kopproteīna daudzumu.

### LITERATŪRA

1. Adam, C.L. Husbandry. In: Alexander T.L., Buxton D. (eds) *Management and Diseases of Deer*. A Handbook for Veterinary Surgeon (Second Edition). AVeterinary Deer Society Publication, London, 1994; 44-74.
2. Bondi, A.A. Animal Nutrition. John Wiley&Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1992; 540.
3. Fletcher, J. Deer Farming in Europe. In: Hudson R.J., Drew K.R. and Baskin L.M. (eds.) *Wildlife Production Systems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989; 323-334.
4. Fraser, D.G.E., Termansen, M. et al. Using Past Climate Variability to Understand how Food Systems are Resilient to Future climate change. **In:** Zollitsch W., Winckler C., Waiblinger S. and Haselberger A.(eds) *Sustainable Food Production and Ethics*. Wageningen Academic Publishers, Vienna, Austria. 2007; 139-144.
5. Meteoroloģijas centrs. Laika apstākļu raksturojums. (2010) Pieejams:<http://www.meteo.lv/public/30669.html>, Skatīts 01.06.2010.
6. Nahm, K.H., Carlson, C.W. The Possible Minimum Chicken Nutrient Requirements for Protecting the Environment and Improving Cost Efficiency. **In:** Nahm K.H. and Nahm B.A. (eds) *Poultry Production and Waste Management*. Yu Han Publishing Co. 2004; 41-64.
7. Osītis, U. Dzīvnieku ēdināšana kompleksā skatījumā. LLKC, Ozolnieki, 2004; 182.-210 ; 364.
8. Paeglītis, D., Dusaliņeva, I., Flečers, Dž., Skriba, G. *Staltbriežu audzēšana un selekcija (Breeding and Selection of Red Deer)*. Rīga: SDAA, 2006; 10.-30.
9. Patterson P.H. Minimizing nutrient waste. *Feed Management*. 1998; 48 (12):21-22.
10. Paulesich, R., Bohlander, K., Halsberger, A.G. Integration of Resilience into sustainability model for analysis of Adaptive Capabilities of Regions to Climate change: the EASY model. **In:** Zollitsch W., Winckler C., Waiblinger S. and Haselberger A.(eds) *Sustainable Food Production and Ethics*. Wageningen Academic Publishers, Vienna, Austria. 2007; 145-150.
11. Tuckwell, C. *The Deer Farming Handbook*. Australian government, Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. 03/029., Canberra, 2003; 97.

# ŪDENS AKTIVITĀTE ( $A_w$ ) UN PH KĀ *LISTERIA MONOCYTOGENES* RĪSKA RĀDĪTĀJI ŠĶĒLĒS SAGRIEZTIEM GAĻAS PRODUKTIEM

## WATER ACTIVITY ( $A_w$ ) AND PH AS RISK SHOWING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN SLICED MEAT PRODUCTS

**Indulis Silinš<sup>1</sup>, Edgars Liepiņš<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pārtikas un veterinārais dienests, Dienvidzemgales pārvalde,  
Food and Veterinary Service, Dienvidzemgale branch, Latvia,

<sup>2</sup>LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija  
LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[forest.con@apollo.lv](mailto:forest.con@apollo.lv), [Edgars.Liepins@llu.lv](mailto:Edgars.Liepins@llu.lv)

### ABSTRACT

The widespread non-spore forming gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) is a food pathogen bacteria and the causative agent of listeriosis. Outbreaks of listeriosis have been associated with milk, cheese, vegetables and meat products. The aim of study was to determine water activity ( $a_w$ ) and pH values in meat products – sausages, smoked meat and cold smoked sausages, as a risk factor of *L. monocytogenes* growing or survival. Completely were examined 110 samples, acquired in Latvia shops.  $a_w$  and pH was measured instrumentally at the Food and Environmental Hygiene institute (Faculty of Veterinary medicine) of the Latvia University of Agriculture. Except cold smoked sausages, all meat products had  $a_w > 0.92$  and  $5.75 < \text{pH} < 6.20$  values, supporting the eventual risk of *L. monocytogenes* growing.

**KEY WORDS:** meat products, *L. monocytogenes*, risk, water activity, pH.

### IEVADS

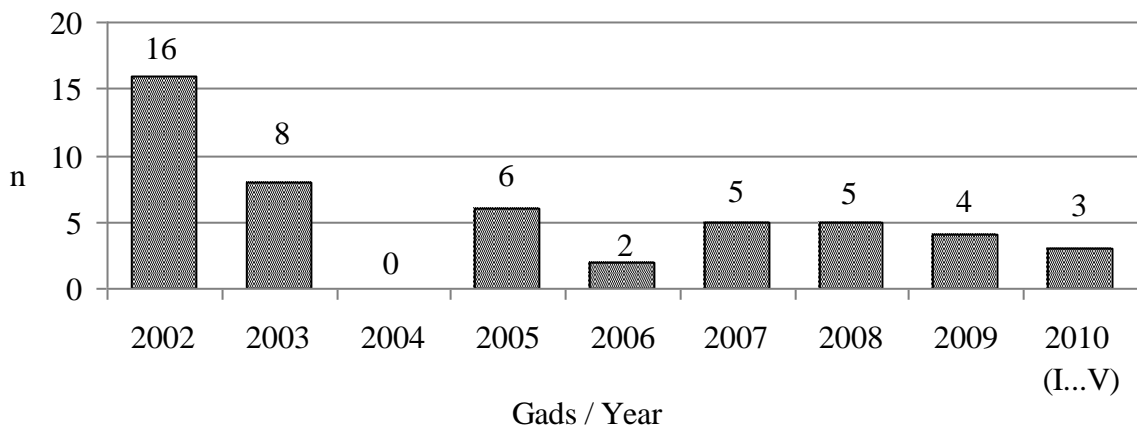
Termiski apstrādātiem, lietošanai gataviem gaļas produktiem mikrobioloģiskās bīstamības Eiropas Savienībā spēkā esošā likumdošanā nav deklarētas. Šādu „nevērību” attaisno produkta sagatavošanas tehnoloģiskajā procesā sasniegtā temperatūra, kas inaktīvā varbūtējās pārtikas infekciju ierosinātājas baktērijas, kā arī tālākie gatavās produkcijas uzglabāšanas apstākļi – relatīvi zema, baktēriju augšanai nepiemērota temperatūra. Lietošanas ērtumam daudzi gaļas produkti tiek papildus sagriezti gabalos vai šķēlēs un šajā procesā var tikt mikrobioloģiski kontaminēti no griešanas iekārtu un instrumentu virsmām, galvenokārt, ar persistējošo baktēriju, tādām kā *Listeria* spp. celmiem, uzturot risku saslimt ar listeriozi.

Listērijas ir plaši sastopamas dabā - ūdenī, augsnē, uz dārzeniem. Tās ir ļoti noturīgas, apkārtējā vidē var saglabāties līdz 7 gadiem (Brooks et al., 1998). Vārot un pasterizējot iet bojā 3 minūšu laikā. Spēj augt 4.0°C temperatūrā gaļas produktos (Lunde'n et al., 2003), bet selektīvās barotnēs laboratorijā ar ilgu (174 h) lag fāzi -1.5°C (Hudson et al., 1994), iztur sasaldēšanu, tādēļ to sauc par ledusskapja baktēriju. (Lag fāze = laiks, kurā šūna piemērojas videi un sāk dalīšanos.)

Listerioze ir atipiska pārtikas infekcija un tās izraisītājs ir *Listeria monocytogenes* – viena no sistemātikā iekļautajām 6 sugām (Vazquez-Boland et al., 2001). Pēdējo gadu



desmitu epidemioloģiskie pētījumi rāda, ka galvenais inficēšanās ceļš cilvēkiem ir alimentārais (Thevenot et al., 2005) - lietojot uzturā tehnoloģiski nepareizi sagatavotus vai nepareizi uzglabātus pārtikas produktus. Eiropā tā ir samērā reta slimība, starp 1 miljons iedzīvotāju reģistrē vidēji 2 - 7 saslimšanas gadījumus. Listeriozei starp citām pārtikas infekcijām ir samērā augsta mirstība, vidēji 30 - 40%. Viens no apjomīgākiem saslimšanas gadījumiem pēc gaļas produktu lietošanas reģistrēts 2008. gada augustā Kanādā, kad no 57 saslimušajiem nomira 22 (38.6%) (Gilmour et al., 2010). Viena no pirmajām pasaulē Amerikas Savienotās Valstis ir noteikušas 0 kontaminācijas līmeni ar *L. monocytogenes* lietošanai gataviem gaļas produktiem (Shank et al., 1996). Latvijā reģistrētie listeriozes gadījumi zināmi pēc valsts aģentūras Latvijas infektoloģijas centrs (Latvia Infectology Centre, LIC) publicētajiem datiem un apkopoti 1. attēlā.



1.attēls. Latvijā reģistrētie humānās listeriozes gadījumi (n) 2002. – 2010. gg  
 Figure 1. The approved cases (n) of human listeriosis in Latvia, yy 2002 – 2010  
 (Data source: LIC <http://www.lic.gov.lv/index.php?p=1327&pp=10756&lang=258>)

Kontaminācijas līmenis 0 nenozīmē, ka produktā nav dzīvotspējīgu listēriju. Nosakot *L. monocytogenes* skaitu 1 gramā produkta ar koloniju skaitīšanas metodi, iegūst rādītāju – kolonijas veidojošās vienības 1 gramā produkta ( $\text{kvv g}^{-1}$ ), kuram ir vērtība, ja pārbaudāmā produkta gramā reāli ir vairāk par 100 uz barotnes plates augt spējīgām šūnām (Augustin, Carlier, 2000).

Šodien pārtikas mikrobioloģiskā riska pētījumi sāk padziļināt izpratni par baktēriju un t.sk. *L. monocytogenes* augšanas īpatnībām dažādos produktos. Modificējot vides apstākļus, pētījumi notiek individuālu šūnu līmenī (Augustin, Guillier, 2006), kas tiek salīdzināti ar populācijas augšanas parametriem – ar iespējamo variāciju līdz 60%. J.C. Augustin un L. Guillier (2006) izdala 18 dažādus augšanas parametrus, kuri ar klasteru analīzi sagrupēti galvenajos 4: temperatūra,  $a_w$ , pH un produkta sastāvs un struktūra.

Jēdzienu **ūdens aktivitāte** ( $a_w$ , angļu val. - water activity) pirmo reizi sāka lietot austrāliešu zinātnieks W.J. Skots (Scott, 1953), lai raksturotu mikroorganismiem izmantošanai pieejamā ūdens stāvokli pārtikas produktos un pierādītu mikroorganismu augšanas atkarību no šī stāvokļa. Pēc fizikālās būtības ūdens aktivitāte ir attiecība starp produktā esošā ūdens brīvās, daļēji saistītās un teorētiski iespējamo piesātinātā tvaika spiedienu  $p$  un piesātinātā tvaika spiedienu  $p_0$ .

$a_w$  skaitliski ir robežās no 0.00 līdz 1.00 un ir noteikts kā mikrobioloģisko bīstamību raksturojošs parametrs daudziem pārtikas produktiem un, kā augšanu limitējošais rādītājs daudzām mikroorganismu grupām.

*L. monocytogenes* augšanai nepieciešamā  $a_w$  vērtība pārtikas produktā ir  $\geq 0.92$  (Augustin, Carlier, 2000). Augstāk pieminētā formula ir tuvināts aprēķins, kas pilnībā

apmierina prakses vajadzības. Dziļāka jēdziena teorētiskā izpratne balstās uz termodinamisko un fizikāli – ķīmisko sistēmas analīzi (Van den Berg and Bruin, 1981).

Tiek uzskatīts, ka *L. monocytogenes* augšana optimāla sastāva barotnē nenotiek, ja pH vērtība ir  $\leq 4.4$  (George, Levett, 1990; Degenhardt, Sant'Anna, 2007).

Lai gan svarīgāko mikroorganismu augšanas faktoru – ūdens aktivitātes un pH mērījumi pārtikas produktiem ar šodienas ierīcēm un augstu precizitāti izdarāmi dažu minūšu laikā, to izmantošana raksturīga, galvenokārt, pētniecisko mērķu sasniegšanai. Lai ieinteresētu Latvijas pārtikas uzraudzības iestādes un ražotājus ātrā un praktiski viegli izpildāmā pārtikas produktu mikrobioloģiskā riska novērtēšanas metodē, par aprakstītā pētījuma mērķi kļuva  $a_w$  un pH mērījumi šķēlēs sagrieztiem gaļas produktiem un to *L. monocytogenes* riska novērtējums.

## **MATERIĀLS UN METODIKA**

Pētījums veikts LLU VMF Pārtikas un vides higiēnas institūtā 2010. gada maija – jūlija mēnešos. Pārtikas tirdzniecības vietās iegādātiem 110, sagrieztiem šķēlēs (gabalos) un iesaiņotiem gaļas produktiem instrumentāli izmērija  $a_w$  un pH. Ūdens aktivitāti noteica ar elektronisku mērīšanas ierīci „PawKit” (DECAGON, ASV), ko pārbaudīja un kalibrēja, izmantojot koncentrētu (6.0 mol) NaCl šķīdumu. Ierīces garantētā mērījuma precizitāte bija  $\pm 0.02 a_w$ , mērījuma ilgums 5 minūtes. pH mērījumus veica ar Testo 205 pH-metru, kas aprīkots ar automātisku temperatūras kompensācijas funkciju (ražotājs TESTO AG, Vācija). Ierīces kalibrāciju un verifikāciju veica pēc 2-punktu kalibrēšanas metodes izmantojot pH 4.01 un 7.00 standarta šķīdumus. Mērījumu precizitāte  $\pm 0.01$  pH, indikācijas stabilizācija ~60 sekundes. Riska novērtēšanai izmantota jautājumu – punktu matrica, kuras modifikācijas tiek pielietotas produktu ražošanas kvalitātes vadības standartu shēmās (LVS EN ISO 22000:2005, 2006), kas redzama 1. tabulā.

***L. monocytogenes* riska novērtējuma kritēriji, to līmeņi un novērtējuma punkti**  
**The qualitative and quantitative assessment of *L. monocytogenes* risk parameters**

Kritēriji Parameters	Kritēriju kvantitatīvais (punkti) un kvalitatīvais vērtējums Kvantitative (points) and qualitative values of LM Risk parameters		
	(1p)	(2p)	(3p)
a) varbūtība, ka produktā ir LM possibility of LM contamination	zema low	vidēja middle	augsta high
b) augšanas atkarība no temperatūras growth depending of temperature	neuztur not support	uztur support	optimāla optimal
c) $a_w$ ietekme uz LM augšanu effect of $a_w$	neuztur not support	uztur support	optimāla optimal
d) pH ietekme uz LM augšanu effect of pH	neaug no growth	iespējams growth/no growth	optimāla optimal
e) produkta sastāva ietekme effect of structure	nomāc suppressed	neietekmē neutral	veicina support
f) fona mikrofloras ietekme effect of common bacteria	nomāc suppressed	neietekmē neutral	veicina support
g) relatīvais uzglabāšanas laiks shelf storing time	īss short	vidējs medium	pārsniedz lag exceed lag

Atkarībā no kritēriju (a – g) kvalitatīvā novērtējuma, matricā tiek ierakstīta punktu vērtība. Konkrētajā modelī minimālā iespējamā punktu summa ir 7, bet maksimālā – 21. Ja novērtējums ir 14 punkti un vairāk, vērtējamais produkts tiek iekļauts paaugstināta riska produktu grupā kā potenciāls *L. monocytogenes* kontaminants. Ja kaut viena kritērija novērtējums ir 1 punkts, neatkarīgi no punktu kopsummas, produkts tiek iekļauts zema riska grupā – *L. monocytogenes* drošs produkts. Riska matricā ietver to kritēriju skaitu, kas ir nozīmīgi analizētajam riska uzturētājam – šajā gadījumā būtiskus parametrus, kas nepieciešami *L. monocytogenes* izdzīvošanai un augšanai lietošanai gatavos gaļas produktos.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Šķēlēs vai gabalos sagrieztajām vārītajām desām un karstā kūpinājuma gaļas produktiem sekundārais piesārņojums ar *L. monocytogenes* no griešanas iekārtu virsmām un instrumentiem ir salīdzinoši bīstamāks nekā sākotnējais izejvielās. Sagrieztā iesaiņotā produkta uzglabāšana temperatūrā < 6 °C dod augšanas priekšrocības tieši *L. monocytogenes* (Lunde'n et al., 2003). Gadījumos, kad produkta  $a_w > 0.92$  un pH 5.0 – 6.5 intervālā, bet uzglabāšanas temperatūra bremzē saprofīto un pienskābo baktēriju augšanu, *L. monocytogenes* iespējams augšanas temps gaļas produktos, ar plašu metodi nosakāmo skaitu palielinot par 1 lg, ir aptuveni 500 h (Augustin et al., 2005). Iepakoto, termiski apstrādāto un šķēlēs sagriezto gaļas produktu, kā arī aukstā kūpinājuma produktu LM riska novērtējuma rezultāti redzami 2. tabulā.

***Listeria monocytogenes* riska vērtības šķēlēs sagriežtiem, iesaiņotiem gaļas produktiem**

**The values of *Listeria monocytogenes* risk in sliced and packed meat products**

Riska vērtējuma parametri Risk assessment parameters		Vārītas desas Boiled sausages		Pusžāvētas desas Smoked sausages		Kūpināta gaļa Smoked meat		Vistas gaļas produkti Poultry products		Fermentētas desas Cold smoked sausages		Fermentēta gaļa Cold smoked meat	
		$\bar{X}^*$	p <sup>**</sup>	$\bar{X}$	p	$\bar{X}$	p	$\bar{X}$	p	$\bar{X}$	p	$\bar{X}$	p
Varbūtība Possibility	a	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
Temperatūra, °C Temperature	b	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2
a <sub>w</sub>	c	0.95	3	0.95	3	0.94	2	1	3	0.82	1	0.92	2
pH	d	6.12	3	5.85	3	6.05	3	6.3	3	4.72	1	5.75	2
Sastāvs Structure	e	±	2	±	2	±	2	±	2	-	1	-	1
Probiotiki Probiotics	f	nav	2	nav	2	nav	2	nav	2	ir	1	ir	2
Dienas Storing days	g	< 30	2	< 20	2	< 30	2	< 20	1	> 30	1	> 30	1
Punkti Summary points		17		17		16		16		10		13	

\*  $\bar{X}$  – mean value; \*\* p – points

Varbūtība, ka produkts sagriešanas laikā tiks kontaminēts ar *L. monocytogenes*, pieņemta kā 1.0 (neizbēgama) visām produktu grupām, jo bīstamība var realizēties tikai tad, ja tās ierosinātais piedalās. Arī uzglabāšanas temperatūra 6 °C bija vienāda visām produktu grupām, līdz ar to a kritērija nozīme dod 3 punktus, bet b kritērija nozīme LM riska uzturēšanā novērtēta ar 2 punktiem.

Ūdens aktivitāte (a<sub>w</sub>) un pH (c un d kritēriji) būtiski neatšķīrās starp termiski apstrādāto produktu grupām un to vērtības ir optimālas *L. monocytogenes* augšanai, saņemot 3 punktus riska novērtējumā. Fermentēto desu un fermentētās gaļas produktu a<sub>w</sub> un pH mērījumi būtiski atšķīrās gan savstarpēji (p<0.01), gan no termiski apstrādātajiem produktiem (p<0.001). Fermentētās desas abos gadījumos atbilst zema riska novērtējumam (1 punkts), bet aukstā kūpinājuma gaļas produktu c un d kritēriji novērtēti kā vidēji riskanti (2 punkti).

Sastāva un probiotiķu nozīme karstās apstrādes produktiem nav pilnībā novērtējama, tāpēc riska faktoru varbūtējai ietekmei 2 punkti. Rūpnieciskā ražojuma aukstā kūpinājuma (fermentētās) desas obligāti satur probiotiķu piedevas, kas nomāc citus mikroorganismus un nodrošina zemu pārtikas infekciju risku (1 punkts).

Produkta ražotāja piešķirtais uzglabāšanas ilgums ir jāvērtē atkarībā no pārējiem kritērijiem. Ja produktam kādā no iepriekšējiem kritērijiem ir 1 punkta vērtējums, uzglabāšanas termiņa kritērijam nav lielas nozīmes riska uzturēšanā. Pretējā gadījumā

nevar izslēgt *L. monocytogenes* skaita palielināšanos līdz kritiskajam līmenim – 2 lg kvv g<sup>-1</sup>, iespēju raksturojot ar lag fāzes vērtību, kas, piemērojot J.C. Augustin et al. (2005) pētījumus, varētu būt ~20 dienas. Līdz ar to vārīto desu, pusžāvēto desu un karstā kūpinājuma gaļas produktu grupām uzglabāšanas ilguma risks novērtēts ar 2 punktiem, bet vistas gaļas produktiem (uzglabāšanas termiņš mazāks par 20 dienām) un aukstā kūpinājuma produktiem ar 1 punktu.

Riska punktu summa 14 ir kritiskā robeža, lai produktu iekļautu riska grupā un rūpīgi izstrādātu priekšnosacījumu pasākumus visā produkta tapšanas procesā. Neatkarīgi no punktu summas, ja kaut viens kritērijs novērtēts kā *L. monocytogenes* augšanu kavējošs, produkts nebūtu iekļaujams LM riska grupā.

## SECINĀJUMI

Termiski apstrādāto šķēlēs sagriezto, iesaiņoto gaļas produktu ūdens aktivitātes un pH vērtības ir optimālas *L. monocytogenes* augšanai un skaita palielināšanai iespējamās kontaminācijas gadījumā, kas uztur vienas no pārtikas infekcijas slimībām – listeriozes risku.

Aukstā kūpinājuma (fermentēto) desu un gaļas produktu ūdens aktivitātes un pH vērtības neuztur *L. monocytogenes* augšanu, kas atļauj šo gaļas produkta veidu iekļaut listeriozes zema riska grupā.

Jautājumu – punktu matrica varētu tikt izmantota ne tikai listeriozes ierosinātāja riska novērtēšanai šķēlēs sagrieztiem, lietošanai gataviem gaļas produktiem, bet arī citu pārtikas infekciju izraisītāju riska apzināšanai un produktu ražošanas kvalitātes vadībā.

## LITERATŪRA

3. Augustin, J.C. and Carlier V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 2000; 56: 53–70.
4. Augustin, J.C., Zuliani V., Cornu M. and Guillier L. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2005; 99: 1019-1042.
5. Augustin, J.C. and Guillier L. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2006; 111: 241-251.
6. Brooks, G.F., Butel J.S. and Morse S.A. Non-Spore forming gram-positive bacilli. In: E. Jawetz, J.L. Melnick and E.A. Adelberg's (eds) *Medical Microbiology*, 21<sup>st</sup> ed. Appleton and Lange, Connecticut, 1998; 194-195.
7. Degenhardt, R. and Sant'Anna E.S. Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007; 38: 309-314.
8. George, A.E. and Levett P.N. Effect of temperature and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in coleslaw. *International Journal of Food Microbiology*, 1990; 11: 345-349.
9. Gilmour, M.W., et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*, 2010; 11: 120-124. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/120> (Skatīts 15.07.2010.)
10. Hudson, J.A., Mott S.J. and Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmospherepackaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*, 1994; 57: 204-208.

11. Lunde'n J., Autio T. and Korkeala H. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 2003; 66: 2062–2069.
12. LVS EN ISO 22000:2005 Pārtikas drošības pārvaldības sistēmas. Prasības jebkurai pārtikas aprites ķēdes organizācijai. LVS, 2006; 62.
13. Scott, W.J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Australian Journal of Biological Science*, 1953; 6: 549-564.
14. Shank, F.R., Elliot E.L, Wachsmuth I.K. and Losikoff M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Control*, 1996; 7: 229–234.
15. Thevenot, D., Delignette-Muller M.L., Christieans S. and Ver-nozy-Rozand C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2005; 101: 189-200.
16. Van den Berg, C. and Bruin S. Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. In: L. Rockland and G. F. Stewart (eds) *Water activity: Influences on food quality*, New York, Academic Press, 1981; 1–61.
17. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, 2001; 14: 584-640.

# THE OVARY ACTIVITY IN COWS WITH AND WITHOUT RETAINED FETAL MEMBRANES

**Santa Skuja, Vita Antāne**

LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[santa.skuja@inbox.lv](mailto:santa.skuja@inbox.lv) , [vita.antane@llu.lv](mailto:vita.antane@llu.lv)

## ABSTRACT

The aim of the study was to find out the ovary activity in cattle with and without retained fetal membranes. Sixty cows of different age of Latvian black-and-white breed from two Joint Stock Companies were used in the present research. The animals were divided into two groups: control group (cows without retained fetal membranes - NRFM) of 15 cows and 45 cows with retained fetal membranes (RFM). Research was performed from September 2007 to January 2009. The level of progesterone in blood serum and rectal ultrasonography were used to establish the ovary activity in cows. The serum progesterone concentration was analyzed every two days for six weeks. The mean serum progesterone concentration during the first 14 days postpartum (PP) in cows with and without RFM was under 1ng/ml. Subsequently (day 18 to 32), progesterone concentration in cows with RFM increased from  $1.24 \pm 0.14$ ng/ml to  $6.43 \pm 0.76$ ng/ml but in NRFM (day 18 to 30) the progesterone increased from  $0.74 \pm 0.11$ ng/ml to  $3.40 \pm 1.15$ ng/ml. On day 42 PP, the progesterone level was decreased in both groups of cows: in RFM group to  $3.34 \pm 0.32$  ng/ml, in the NRFM group to  $1.97 \pm 0.68$  ng/ml ( $P < 0.05$ ). When analysing the progesterone concentration in blood in individual animals during six weeks PP, it was found out that progesterone level was constantly low ( $< 1$ ng/ml) in 32% of RFM cows and 20% of NRFM cows. The obtained results with ultrasonograph confirmed the ovary functional condition that was established according to the changes of the progesterone concentration in blood.

It was concluded that in cows with retained fetal membranes the progesterone level postpartum was higher and decreased later in comparison with control group cows that could be the reason for a delayed folliculogenesis and ovulation.

**KEY WORDS:** ovary, cows, ultrasonography, progesterone, retained fetal membrane.

## INTRODUCTION

During the postpartum period, the uterus involution takes place and the ovary activity is renewed. Ten days postpartum, an antral follicle is found in ovaries indicating the beginning of a new follicular phase. In this time, the progesterone level in blood is low. In milking cows, the ovary activity and the increase of progesterone level in blood start a new in 18-25 days post partum (Senger, 2005).

In cows with retained fetal membranes and without retained fetal membranes the mean progesterone level just postpartum is similar and below 1ng/ml (Bosu et al., 1984; Chew et al., 1977). Two days later it increases and in cows with RFM reaches  $3.4 \pm 0.3$  ng/ml, and in cows without RFM  $2.3 \pm 0.1$  ng/ml (Chew et al., 1977). Kaczmarawski et al. (2006) reported, that in cows with RFM the progesterone concentration in blood 12-24 h postpartum is significantly higher (2,61 mmol/l) than in NRFM cows (1,59 mmol/l), and in cows with developed metritis the progesterone concentration decreases slower. Holt et al. (2010) has found the corpus luteum in the ovaries of cows with RFM

on the 27<sup>th</sup> day postpartum and the serum progesterone level 3.34 ng/ml, whereas in the control group cows the increase of progesterone level (4.66 ng/ml) and the corpus luteum are found on day 21<sup>st</sup> postpartum.

In animals with a delayed activity of ovaries, periparturient disorders such as dystocia, retained fetal membranes, metabolic disorders and metritis are observed (Thatcher et al., 2006). Könyves et al. (2009) report that retained fetal membranes result in a delayed renewal of the ovary activity and an increased interval between the parturition and the first ovulation. In cows with retained fetal membranes, bacterial number is increased in the uterus that reduces follicular activity in the ipsilateral ovary. Sheldon et al. (2002) in their research proved that the uterus bacterial contamination postpartum at the same time affected folliculogenesis but did not affect the ovarian follicle wave emergence.

Early emergence of the ovary activity postpartum indicates an optimal calving-conception interval. Opsomer et al. (2000), Youngquist and Bierschwal (1985) report their research results that if the progesterone level increases before the 50<sup>th</sup> day postpartum, then can observe a regular estrus. On the contrary, the absence of estrus until the 50<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> day postpartum may prolong the calving-conception period, consequently causing great economic losses (Zduńczyk et al., 2002; Opsomer et al., 2000).

Domecq et al. (1997) report that the length of the dry period and body condition of cows are very important and later can affect the postpartum process (milk fever, retention of fetal membranes, metritis, abomasal displacement, lameness). The risk of retained placenta is greater for cows that are underconditioned at drying off (Markusfeld et al., 1997). On average, the dry period is 60 days. If this period is longer than 77 days, then the risk of development of delayed ovarian activity is 2.9 times greater (Opsomer et al., 2000).

A negative energy balance influences the formation of hypothalamic gonadotropin releasing hormone which, in its turn, influences folliculogenesis and ovulation (Vanholder et al., 2006; Wathes et al., 2007). The negative energy balance is connected with irregular oestrus that increases the interval to first service and reduces conception rates. If the cow is underconditioned, the follicular development and ovulation is reduced (Wathes et al., 2007; Staples et al., 1990). Feeding cows additionally with dietary fat in early postpartum period, the ovary activity and folliculogenesis is usually stimulated (Butler 2010).

The aim of the present research was to establish the ovary activity in cows with and without retained fetal membranes applying ultrasonography and progesterone level in blood serum.

## **MATERIAL AND METHODS**

Sixty cows of different age of Latvian black-and-white breed from a Joint Stock Company “Agrofirma Tērvete” herd with 650 milking cows in Dobeles region, and from “Daile Agro”, Ltd. herd with 280 milking cows in Jelgava region were used in this research. Animal feed ratio was adequate to the standards of milking cows. On both farms the animal keeping, care and feeding were similar. In winter, on both farms animals were kept in the barn in tie-stalls and fed on corn, alfalfa, clover and grass crop silage, which was prepared in plastic rolls and mixed in the feed mixer before feeding and distributed by a feed mixer. Before silage feeding, concentrated mixed feed (barley+wheat) with microelements, rape seed oil-cake and salt was fed. The herd of “Agrofirma Tērvete” was also fed with beer distillery refuse together with the concentrated mixed feed. Several times a week, hay was fed on both farms. Molasses



was poured on the silage and hay. In summertime, cows of both farms were grazing twenty-four hours, and at the time of milking they were fed on concentrated mixed feed with microelements, salt and rape seed oil-cakes. On the farm of “Agrofirma Tērvete”, animals were fed with beer distillery refuse also in summertime. Research was carried out from September 2007 to January 2009.

Cows were divided into groups according to the process of the third stage of parturition (expulsion of fetal membranes) and applied treatment: control group where fetal membranes were expelled within 8-12 hours (n=15) and three groups of cows with retained fetal membranes:

1<sup>st</sup> group – cows whose fetal membranes were removed manually and cows treated (n=15);

2<sup>nd</sup> group – cows whose fetal membranes were not removed but were treated (n=15);

3<sup>rd</sup> group – cows whose fetal membranes were not removed and were not treated (n=15).

Cows with RFM were administered antibacterial and prostaglandin F<sub>2α</sub> parenteral and intrauterin therapy.

Blood for the progesterone level estimation was sampled 48 hours after 4, 6, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 28, 30, 32 un 42 days postpartum. The samples were collected in 7 ml sterile disposable vacuumteiner tubes without anticoagulant from the tail vein and were examined in the accredited laboratory „Central Laboratory”, Ltd. complying with the standard analyses requirements by *Alecsis 2010* (Roche Diagnostics). Ultrasonography of ovaries was performed 14, 18, 22, 28 un 42 days postpartum by *Tringa Linear VET* (Esaote piemedical) ultrasonograph.

This diagnostic ultrasound scanner equipped with a linear-array, 7.5 MHz rectal transducer was used to monitor follicular size, ovulation and formation and regression corpus luteum. Ovarian follicles are fluid-filled structures surrounded by an inner layer of granulose cells and an outer layer of thecal cells. Fluids absorb rather than reflect ultrasound waves, it means that follicles appear as black circular structures surrounded by echogenic ovarian tissue. Corpus luteum appears as distinctly echogenic as within the ovarian stroma. Mostly corpus luteum appears as a solid tissue masses but may also contain fluid filled cavities.

A comparative assessment of progesterone parameters in cows with and without retained fetal membranes was carried out applying Microsoft Excel, performing ANOVA: single factor dispersion analysis, as well as calculating mean arithmetic indices. Differences were considered significant at P<0.05.

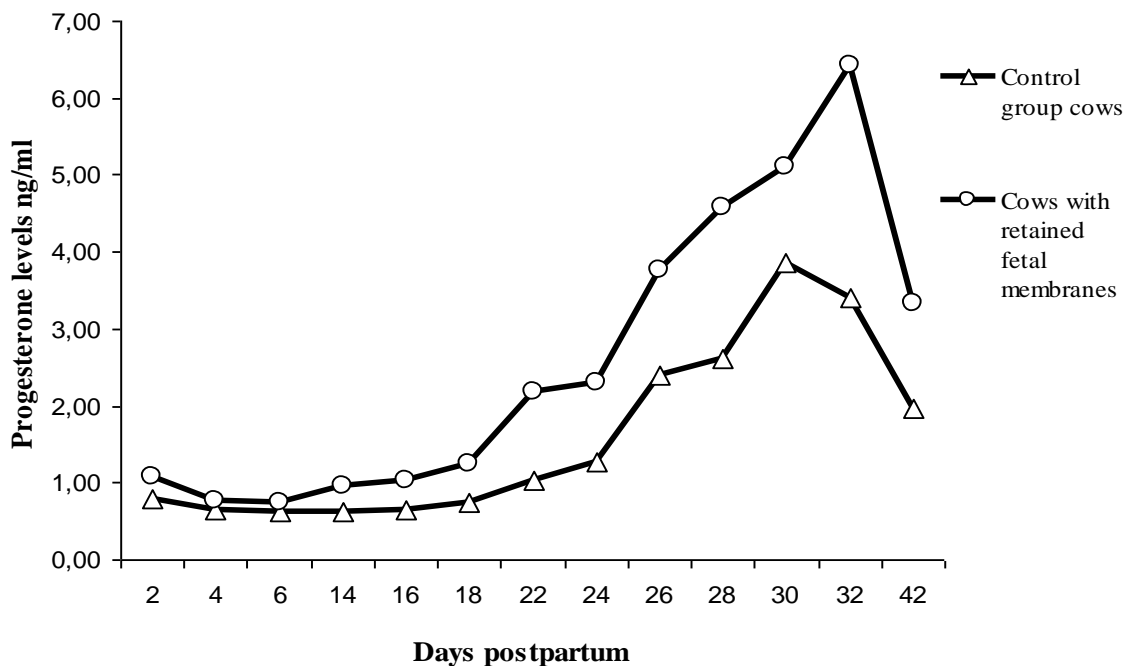
## RESULTS AND DISCUSSION

The ovary activity is characterised by the changes of progesterone concentration of ovarian steroid hormone in milk and blood. Usually, the first serious increase of the progesterone level is observed on average around the 34<sup>th</sup> and 37<sup>th</sup> day postpartum. Nevertheless, due to modern dairy animal husbandry the raise of progesterone level is observed already around the 30<sup>th</sup> day postpartum (Opsomer et al., 2004; Wathes et al., 2007). In cows postpartum with retained fetal membranes the progesterone level in the blood serum is within the range from 0.10-0.60 ng/ml to 3.50ng/ml in some cases (Opsomer et al, 1999).

In this research the mean serum progesterone concentration during the first 14 days PP in cows with and without RFM was under 1ng/ml (Figure 1). Subsequently (day 18 to 32), progesterone concentration in cows with RFM increased from 1.24 ± 0.14ng/ml to 6.43 ± 0.76ng/ml but in NRFM (day 18 to 30) the progesterone increased from 0.74 ±

0.11ng/ml to  $3.40 \pm 1.15$ ng/ml. The obtained results show that in cows with RFM luteal phases are longer because the progesterone concentration in the blood serum remains high even after the 30<sup>th</sup> day postpartum. Whereas in cows of NRFM group at this time a decrease of progesterone concentration is observed. Mateus et al. (2002) and Opsomer et al. (2000) in their investigations report that cows with some health problems have prolonged luteal phases.

Next time progesterone was established on the 42<sup>nd</sup> day postpartum, the progesterone level was decreased in both groups of cows: in RFM group to  $3.34 \pm 0.32$  ng/ml, in NRFM group to  $1.97 \pm 0.68$  ng/ml ( $P < 0.05$ ) (Figure1). The decrease of progesterone level at this time indicates onset of pro-estrus and estrus phase. Ultrasonography showed evidence that until the 14<sup>th</sup> day ovaries were inactive – small, with smooth surface and with 2mm large several follicles. Some cows had an antral follicles in ovaries. On the 18<sup>th</sup> day in most of the research groups cows there were observed one or two follicles of various sizes (5-8mm), but on the 22<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> day corpora luteum of various sizes were observed. On day 42 regression of the corpus luteum and development of new follicles were observed. The obtained results confirm the ovary functional condition established by the changes of progesterone concentration in the blood serum.



**Figure 1. Progesterone levels in cows with and without retained fetal membranes  
45 cows with RFM, 15 cows without RFM**

Analyzing cows with RFM treated with different methods and NRFM cows, progesterone level was low in all the groups in the following tests till the day 18 (Fig. 2). On day 22 progesterone level was increased, especially in cows with RFM whose fetal membranes were not removed and cows treated – the second group ( $2.95 \pm 1.18$ ng/ml). Greater progesterone level on day 28 was observed in cows with RFM whose fetal membranes were not removed and cows were not treated – the third group ( $5.80 \pm 1.86$ ng/ml), but on day 32 in cows with RFM whose fetal membranes were removed manually and cows treated – the first group ( $7.78 \pm 2.30$ ng/ml) and the third group ( $6.16 \pm 2.28$ ng/ml). At the same time in the control group of cows the

progesterone concentration decreased. The difference was statistically significant between cows with RFM and control group on day 22, 28 and 32 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

On day 42 the progesterone concentration in all cow groups decreased significantly meaning that most of cows were coming in heat at that time (Fig. 2).

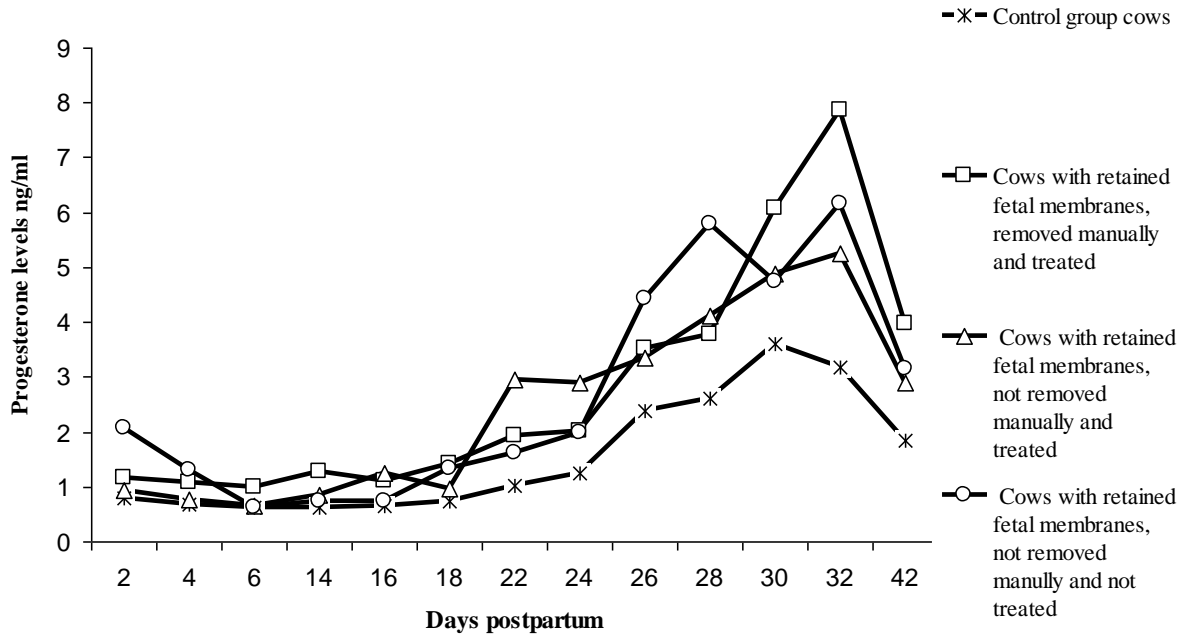


Figure 2. Progesterone levels in the control group and three separate groups of cows with RFM

When analysing the progesterone concentration in blood in individual animals during six weeks PP, it was found out that progesterone level was constantly low ( $< 1 \text{ ng/ml}$ ) in 32% of RFM cows and 20% of NRFM cows (Figure 3). At the same time ultrasonography showed small smooth ovaries. Opsomer et al. (2000), Werth et al. (1996) and Zduńczyk et al. (2002) report in their research if the progesterone level is consequently low during the first 50-60 days postpartum, then there is a delayed cyclicity.

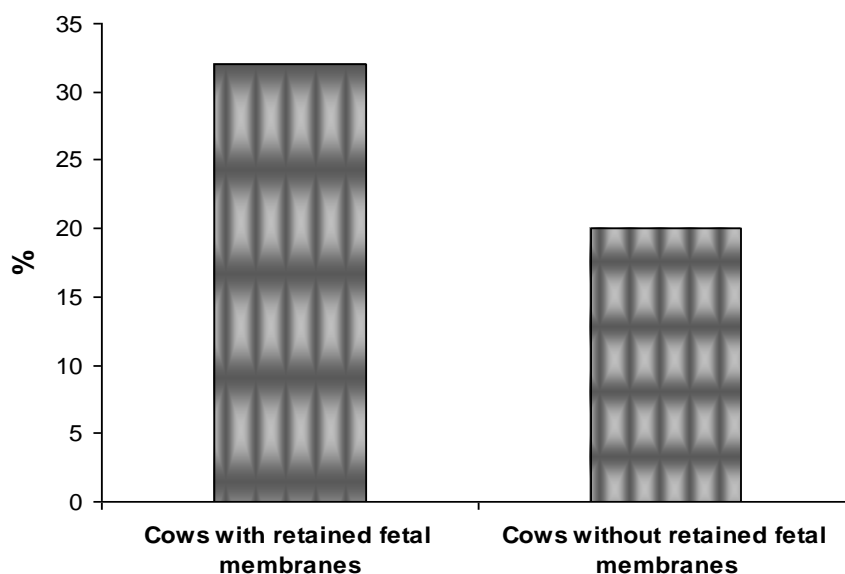


Figure 3. Progesterone levels under 1ng/ml

It should be pointed out that the average dry period of cow groups involved in the experiment did not exceed 77 days and the body condition 3.75 points (Table 1). Nevertheless, some cows of group with RFM (4% of cases) the dry period lasted from 77 to 108 days and the body condition was 4.0 points.

Table 1

**Dry period and body condition in cows with and without retained fetal membranes**

Group of cows	Average dry period, days	Average body condition, points
Control group cows	66±4.84	3.66±0.05
Cows with retained fetal membranes	59±3.74	3.68±0.02

**CONCLUSIONS**

1. In total, in cows with retained fetal membranes the progesterone level postpartum was higher and decreased later in comparison with control group cows, that could be the reason for a delayed folliculogenesis and ovulation.
2. During six weeks postpartum in 32% of retained fetal membranes cows and 20% of control group cows had a low ovary functional activity ( $P_4 < 1\text{ng/ml}$ )
3. In cows with retained fetal membranes in postpartum period a longer luteal phase is observed.
4. The ovary activity estimated by the progesterone concentration in blood gives a conception that is obtained by establishing ultrasonography.

## REFERENCES

1. Bosu, W.T.K., Liptrap R.M., Leslie K.E. Periparturient changes in plasma progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  concentrations in Holstein cows with and without retained foetal membranes – *Animal Reproduction Science*. 1984; 7:6 497-510.
2. Butler, W.R. Dietary fatty acid supplementation and reproduction in dairy cows – Department of Animal Science, Cornell University. Materials from Summer School “Reproductive challenges facing today’s dairy industry”. May 24-28, 2010. Tartu, Estonia.
3. Chew, B.P., Keller H.F., Erb E.R., Malven P.V. Periparturient concentrations of prolactin, progesterone and the estrogens in blood plasma of cows retaining and not retaining fetal membranes – *Journal of Animal Science*. 1977; 44:6 1055-1060.
4. Domecq, J.J., Skidmore A.L., Lloyd J.W., Kaneene J.B. Relationship between body condition scores and milk yield in a large dairy herd of high yield in a large dairy herd of high yielding Holstein cows – *Journal of Dairy Science*. 72:2 233-239.
5. Holt, L.C., WWhittier W.D., Gwazdauskas F.C., Vinson E. Early postpartum reproductive profiles in Holstein cows with retained placenta and uterine discharges – *Journal of Dairy Science*. 1989; 72: 533-539.
6. Kaczmarowski, M., Malinowski E., Markiewicz H. Some hormonal and biochemical blood indices in cows with retained placenta and puerperal metritis - *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*. 2006; 50:89-92.
7. Könyves, L., Szenci O., Jurkovich V., Tegzes L., Tirián A., Solymosi N., Gyulay G., Brydl E. Risk assessment and consequences of retained placenta for uterine health, reproduction and milk yield in dairy cows – *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2009; 78: 163-172/
8. Markusfeld, O., Galon N., Ezra E. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows – *The Veterinary Record*. 1997; 141:3 67-72.
9. Mateus, L., Lopes da Costa L., Bemardo F. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows – *Reproduction in Domestic Animals*. 2002; 37:1 31-35.
10. Opsomer, G., Coryn M., de Kruif A. Postpartum anoestrus in high yielding dairy cows – *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2004; 73: 112-118.
11. Opsomer, G., Gröhn Y.T, Hertl J., Coryn M., Deluyker H., de Kruif A. Risk factor for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows on Belgium: A field study – *Theriogenology* . 2000; 53:4 841-857.
12. Opsomer, G., Wensing Th., Leavens H., Coryn M., de Kruif A. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? 1999; 56: 211-222.
13. Sheldon, M.I., Noakes D.E., Rycroft A.N., Pfeiffer D.U., Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on follicle growth and function in cattle – *Reproduction*. 2002; 123: 837-845.
14. Singer, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition – *Current Conceptions, Inc. USA*. 2005 187-341.
15. Staples, C.R., Thatcher W.W., Clark J.H. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high production dairy cows - *Journal of Dairy Science*. 1990; 73: 938-947.
16. Thacher, W.W., Bilby T.R., Bartolome J.A., Silvestre F., Staples C.R., Santos J.E.P. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow – *Theriogenology*. 2006; 65:30-44.

17. Vanholder, T., Opsomer G., de Kruif A., Leroy J.L.M.R. Interactions between energy balance and ovarian activity in high yielding dairy cows early postpartum: a review - *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2006; 75: 79-85.
18. Wathes, D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J., Fitzpatrick R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow – *Theriogenology*. 2007; 68S: S232-S241.
19. Youngquist R.S. and Bierschwal C.J. Clinical management of reproductive problems in dairy cows – *Journal of Dairy Science*. 1985; 68:2817-2826.
20. Zduńczyk, S., Mwaanga E.S., Małeck-Tepiciit J., Barański W., Janowski T. Plasma progesterone levels and clinical findings in dairy cows with post-partum anoestrus - *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*. 2002; 46: 79-86.

# STUDY OF THE MILK PROTEIN GENETIC CHARACTERIZATION IN LATVIAN DAIRY CATTLE BREEDS POPULATIONS

Dace Smiltina, Andris Bāliņš, Ziedonis Grīslis

LUA, Laboratory of Molecular Genetic Research, Faculty of Agriculture, Latvia  
[dace.smiltina@yahoo.co.uk](mailto:dace.smiltina@yahoo.co.uk)

## ABSTRACT

The aim of this study in Laboratory of Molecular Genetic Research of Faculty of Agriculture in LLU was to perform an initial characterization of milk quality at the protein level of  $\beta$ -casein (*CSN2*) alleles A1 (*CSN2A1*) and A2 (*CSN2A2*) and also at the protein level of  $\kappa$ -casein (*CSN3*) in two different Latvian cattle breeds (Latvian Brown and Latvian Blue). A wide variation in the *CSN3* allele B frequency among Latvian Blue (LZ) and Latvian Brown (LB) breeds was found suggesting that the molecular selection for animals carrying the allele B could impact breeding programs for dairy production in Latvia. The genotyping of *CSN2* alleles A1 and A2 is of the practical importance since the *CSN2A1* associated with the liberation of  $\beta$ -casomorphin-7 and other bioactive peptides with the opioid nature and cause of human non-communicable diseases. The relatively high incidence of the *CSN2* allele A2 is characterisation for the Latvian cows breed populations and this special allele distribution could be used to develop selection strategies to breed specialised lines of Latvian local breeds. The results obtained are as follows: the LB breed (n=96) allele's frequency of *CSN2A1* is 0.703, the LZ breed (n=95) allele's frequency of *CSN2A1* is 0.811.

**KEY WORDS:** cows,  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -casein, gene polymorphism, Gene Assisted Selection (GAS).

## INTRODUCTION

Caseins are milk proteins secreted by mammary gland cells. They constitute about 78-82% of bovine milk proteins and subdivided into four main groups:  $\alpha$ S1-casein,  $\alpha$ S2-casein,  $\beta$ -casein (*CSN2*), and  $\kappa$ -casein (*CSN3*) (Eigel et al., 1984). These proteins and their genetic variants have been extensively studied and reported as an important factor associated with lactation performance, milk composition and cheese yield efficiency (Aleandri et al., 1990). Bovine casein is encoded by a 200 kb DNA fragment located at chromosome (Chr) 6 q31-33 (Ferretti et al., 1990) arranged in the order of  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  and  $\kappa$ .  $\kappa$ -CN fragment spans the 13 kb DNA sequence divided into five exons and intervening sequences and constitutes about 25% of the casein fraction (Martin et al., 2002). The  $\alpha$ S1-,  $\beta$ -, and  $\alpha$ S2-casein is at least 70 kb away from them (Ferretti et al., 1990).

Kappa-casein (*CSN3*) has been extensively studied for its role in stabilizing the casein micelles and its influence on the manufacturing properties of milk. For several breeds, the genetic variability in the *CSN3* locus has been reported each with a different allelic frequency based on genetic diversity among breeds. Various allelic variants have been described for *CSN3* gene in different cattle breeds, which include alleles A, B, C, E, F, G, H, I and AI (See review by Soria et al., 2003). Among these, variants of *CSN3* alleles A and B are most commonly found and variant of *CSN3* allele B is predominantly concerned with processing properties of milk and has better lactodynographic properties (Lin et al., 1992). In variant B, due to a single base

mutation in the *CSN3* locus, isoleucine substitute threonine and aspartic acid is substituted by alanine (Pinder et al., 1991). Selection for the B allele of *CSN3* gene is integrated into cattle breeding programs in many countries and it also have should be done in Latvia too.

Controversial and still unresolved is the role of  $\beta$ -casein (*CSN2*) genetic variants A1 and A2 on dietetic value of milk and it impact up on human health. Studies of *CSN2* genetic polymorphism, which began in 1961 with works of R. Aschaffenburg (1) have a wealth of material on the *CSN2* gene, more than 10 genetic variants and their occurrence in different breeds of cows and their possible correlation with productivity traits. Therefore unanswered questions remain on the role of *CSN2* allele A1 and partly also of *CSN2* allele A2 in liberation of  $\beta$ -casomorphin-7 and other bioactive peptides in the human digestive tract, and their further fate. Many studies point to opioid nature of  $\beta$ -casomorphin-7 and other peptides and the possible effects up on the central nervous system, a certain relationship with the child sudden death syndrome, atherosclerosis, cardiovascular disease and insulin-dependent diabetes mellitus (DM-1) (McLachlan, 2001, Elliot et al., 1999, Teschemacher, 2003). The trustful association between using of *CSN2A1* milk and DM-1 had shown by epidemiological situation in 16 countries of the World, and had calculated correlation of that factor which is very high ( $r=0.75$ ) (Laugesen un Elliott, 2003). The first, which championed the need to reduce the frequency of A1 variant in herds, use only sires with the A2A2 genotype, were dairy cattle breeding organizations in New Zealand (A2 Corporation, 2009). This company sell the special branded milk of *CSN2A2* Premium Brand A2 to New Zealand, the USA, Australia and Asia. We reserve the doubt that it is appropriate to identify someone A1 allele incidence in terms of Latvian dairy cattle populations. Milk protein gene research is needed to obtain the information GAS program development in Latvia.

## MATERIALS AND METODS

Animals were chosen at random from different dairy cattle heards in Latvia. The material involved 191 cows. The blood was taken from the jugular vein and collected in K3-EDTA coated sterile vaccutainers and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used for DNA extraction. DNA for the research of  $\kappa$ -casein (*CSN3*) was extracted using the Fermentas Genomic DNA Purification Kit # KO512. *CSN3* alleles A and B were identified using the PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism) method in accordance with methodology provided by Medrano and Aguilar-Cordova (10) and Sulimova (15). DNA was extracted using the QIAGEN DNeasy Blood@ Tissue kit (USA). The *CSN2* alleles A1 and A2 were identified using the PCR-RFLP method in accordance with methodology provided by Medrano and Sharrow (11) and McLachlan (13) with some our—modifications. DNA primers described by McLachlan (2006) were used to PCR amplification.

## RESULTS AND DISCUSSION

Milk protein genetic polymorphism was studied in Latvia raised breeds – Latvian Brown (LB) and Latvian Blue (LZ). LB breed at the number of animals is the leading in Latvia (150,000) but the LZ breed is one hundred times smaller but it is maintained as a genetic resource population. The study found the extent in which the favoured alleles of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein are represented in both breeds.

**Beta-casein.** The most common is *CSN2* allele A2. Unfortunately the adverse *CSN2A1* frequency of *CSN2A* in Latvian Brown breed population is a high level (Table1); in the preliminary estimation we found frequency of *CSN2* allele A1 0.697, but in the extended material the result of estimation was a little bit greater - 0.703. but



for Latvian Blue breed population the adverse allele's A1 frequency have a much higher level: in the preliminary estimation we found frequency of CSN2 allele A1 is 0.779 (n=61), but in the extended material the result of estimation - 0.811 (n=81).

Table 1

**Frequency of  $\beta$ -casein (CSN2) genotypes and alleles estimated in Latvian Brown (LB) dairy cow breed population**

Genotypes and alleles	Preliminary results (Smiltina,2010)				Extended material			
	n	Frequency			n	Frequency		
		De facto	HW	+/-		De facto	HW	+/-
A1A1	13	0.394	0.486	-0.092	41	0,427	0,494	-0,067
A1A2	20	0.606	0.422	+0.184	53	0,552	0,418	0,135
A2A2	0	0.000	0.092	-0.092	2	0,021	0,088	-0,067
Total	33	1.000	1.000	0	96	1,000	1,000	-
A1		0.697	-	-	-	0,703	-	-
A2		0.303	-	-	-	0,297	-	-

HW – Hardy-Weinberg equilibrium

Breeding opportunities for increasing the desired allele A2 frequency of A2A2 and A1A2 determine the genotype of animals available. Over the two varieties of material (n = 191) found only 4 animals (2%) with the desired genotype A2A2. Also, heterozygous animals appeared relatively small quantities. Over the two varieties were a total of 85 (44.5%) female animals with the genotype A1A2. The animals of the CSN2 undesired genotype A1A1 directly off of the reproduction is not inconceivable, but if they will have mated with the A2A2 genotype CSN2 breeding, then in the F1 generation will be able to obtain heterozygous individuals. The CSN2A2 frequency increases it is necessary to detect A2A2 bulls and the maximum use of breeding work. For increasing of the frequency of CSN2A2 need to discover A2A2 bulls and the maximum use of breeding work.

**Kappa – casein.** In our research of CSN3 the most common allele B have shown ( Table 2 ) that frequency of allele B is 0.316 for LB breed and 0.317 – for LZ breed.

Table 2

**The corresponding genotypes and allele frequency's analysis of CSN3 alleles A and B in Latvian cow breeds**

Genotypes and genes	Latvian Brown			Latvian Blue
	Our results Cows, n=30	(Paura, 2009) Bulls, n=19	(Paura,2009) Cows, n=30	Our results Cows, n=71
AA	0.467	0.632	0.733	0.465
AB	0.433	0.368	0.200	0.437
BB	0.100	0	0	0.099
A	0.684	0.816	0.833	0.683
B	0.316	0.184	0.167	0.317

Planning of the 2 mutually independent gene sampling (CSN2A2 and CSN3B), selection will also determine the effectiveness of the desired gene coincidence readable animals. Our data sample of 108 cases, data have simultaneously on the two locus (3.tab.). These data failed to find not one case where the animals would be homozygous for the preferred alleles while both locus. In seven cases of the 108 possible (6.49%)

was found in one of the preferred homozygous alleles and heterozygous - in the second one. Since the two varieties of the desired alleles' frequencies (CSN2A2 and CSN3B) are in the minority, then in the genotype composition (3.tab.) only 25% of animals have in the desired allele's homo- or heterozygous state, which have also characterized by a random potential of selected for breeding cows.

Table 3

**The incidence of the desirable genotypes of CSN2 and CSN3 in the total sample of LB and LZ dairy cows breeds (N=108)**

N=108	The number of desired genotypes				Total	x
	22BB	22AB	12BB	12AB		
n	0	1	6	20	27	x
%	0	0,93	5,56	18,52	25,00	100,00

Explanations: 22BB – CSN2 A2A2, CSN3 BB;  
 22AB – CSN2 A2A2, CSN3 AB;  
 12BB – CSN2 A1A2, CSN3 BB;  
 12AB – CSN2 A1A2, CSN3 AB.

Favorite opportunities may be able to find the desired alleles homozygous bulls and they are widely used in further breeding work.

**CONCLUSIONS**

1. The frequency of an undesirable bovine milk  $\beta$ -casein allele A1 (CSN2A1) has very high in both populations of the Latvian dairy breeds: Latvian brown breed – 0.703 (n=96), Latvian Blue breed – 0.811 (n=95).
2. The frequency of an undesirable bovine milk  $\beta$ -casein allele A1 (CSN2A1) can reduce by the breeding activities and can create the herds and breeds populations of the CSN2 genotype A2A2 (homozygous for desirable alleles). Critically important is to detect A2A2 breeding bulls and use artificial insemination.

If we want also to increase milk  $\kappa$ -casein B allele frequency at the same time, then the task becomes more complicated, because in the tested two varieties of the breeding material (n=108) we did not find noone animal homozygous for both the preferred alleles' locus (A2A2BB). Work should begin with the heterozygous animals.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The study and publication financed by the project „Support for doctoral studies in LUA” No. / 2009/0180/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/ agreement No. 04.4-08/EF2.D1.13’.

The study was supported also by financing of research Project No. 09.1461 of the Latvian Science Council.

**REFERENCES**

1. Aleandri, RL., Buttazoni, G., Schneider, JC., Caroli, A., et al.. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. Journal of Dairy Sciences, 1990;73: 241-255.
2. Aschaffenburg, R. Inherited casein variants in cow's milk. Nature, 1961; 192 (4801): 431-432.

3. A2 Corporation Limited Minutes of Annual Meeting of Shareholders, 2009; <http://www.a2corporation.com/AGM Minutes 15.10.09.pdf>
4. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A. and Farrell, H.M.. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Sciences*, 1984; 67: 1599-1631.
5. Elliott, R.B., Harris, D.P., Hill, J.P., Bibby, N.J., Wasmuth, H.E. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia*, 1999; 42: 292-296.
6. Ferretti, L., Leone, P., Sgaramella, V. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Research*, 1990; 18: 6829-6833.
7. Laugesen, M., Elliott, R. Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *The New Zealand Medical Journal*, 2003; 116: 1-19.
8. Lin, C.Y., Sabour, M. P. and Lee, A. J. Direct typing of milk protein as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review. *Animal Breed.Abstract*, 1992; 60: 1-10.
9. Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L., Leroux. Ch., The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproductive Nutrition Development*, 2002; 42: 433-459.
10. Medrano, J.F. and Aguilar-Cordova, E. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio/Technology*, 1990; 8:144-146.
11. Medrano, J.F. and Sharrow, L. Genotyping of bovine beta- casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. *Journal of Dairy Sciences*, 1991; 74(1):282
12. McLachlan, C.N. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 2001; 56: 262-272.
13. McLachlan, C.N. Breeding and milking cows for milk free of  $\beta$ -casein A1, 2006; United States Patent 709494
14. Smiltiņa, D., Grīslis, Z., Bāliņš, A. Incidence of  $\beta$ -casein alleles A1 and A2 in Latvian dairy cattle populations. *Baltic Animal Breeding XV Conference, Rīga, 31st May – 1st June, 2010*; 17 – 20.
15. Sulimova, G.E., Azari, M.A., Rostamzadeh, J., Mohammad Abadi, M.R., Lazebny, O.E. kappa-casein gene (*CSN3*) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. *Genetika*, 2007; 43(1): 88-95.
16. Paura, L., Jonkus, D., Jemeljanova, V. Milk protein  $\kappa$ -casein gene and its association to milk productivity traits in Latvian Brown cattle. *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technologies*, 2009; 3 (1): 287-294.
17. Pinder, S. J., B. N. Perry, C. J. Skidmore and D. Savva Analysis of polymorphism in the bovine casein gene by use of polymerase chain reaction. *Animal Genetic*, 1991; 22: 11-22.
18. Soria, L. A., Iglesias, G. M., Huguet, M. U. and Mirande, S. L. A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the bovine kappa-casein gene. *Animal Biotechnology*, 2003; 14: 1-5.
19. Teschemacher, H. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 1331-134.

# DAŽĀDA JERSĪNIJU SASTOPAMĪBA CŪKU LIEMENOS TRIJĀS KAUTUVĒS LATVIJĀ

## DIFFERENT PREVALENCE OF YERSINIAE ON PIG CARCASSES IN THREE SLAUGHTERHOUSES IN LATVIA

**Margarita Terentjeva, Edgars Liepiņš, Aivars Bērziņš**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Pārtikas un vides higiēnas institūts, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Food and Environmental Hygiene,  
Latvia

[Margarita.Terentjeva@llu.lv](mailto:Margarita.Terentjeva@llu.lv)

### ABSTRACT

The aim of the present study was to detect yersinia species and their prevalence on carcasses of slaughter pigs. A total amount of 90 surface swabs of pig carcass were collected in three slaughterhouses in Latvia. All the samples were tested with direct plating, selective enrichment and cold enrichment according to the ISO and NCFA methods. Colonies, which resembled yersinia on CIN agar plates, were confirmed with API 20E kit. *Y. enterocolitica* strains were bio-serotyped. In total, non-pathogenic yersinia – *Y. enterocolitica* biotype 1A, *Y. kristesenii* and *Y. fredriksenii*, and pathogenic yersinia – *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3 species and/or bioserotypes were isolated from pig carcasses. The prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersinia on pig carcasses was 52 and 9 %, respectively. Non-pathogenic yersinia were isolated in all three slaughterhouses, while pathogenic *Y. enterocolitica* 4/O:3 in two slaughterhouses. In total, the prevalence of yersinia on carcasses was 56 %, 66 % and 60 % in slaughterhouses A, B and C, respectively. The prevalence of non-pathogenic yersinia in slaughterhouses B and C was significantly higher than in slaughterhouse A ( $p<0.05$ ). The prevalence of pathogenic yersinia was significantly higher in slaughterhouse A, than in slaughterhouses B and C ( $p<0.05$ ).

**KEY WORDS:** non-pathogenic, pathogenic yersinia, pig head, costal region.

### INTRODUCTION

*Yersinia* genus is a member of Enterobacteriaceae family, which consists from 11 non-pathogenic and 3 pathogenic species. Among the pathogenic species, *Y. pseudotuberculosis* and certain bioserotypes of *Y. enterocolitica* may cause foodborne yersiniosis, while non-pathogenic species are frequently isolated from ill patients and their epidemiological significance is still unclear. Pathogenic yersinia are transmitted to consumers by infected food vehicles, but the case control studies show that in the majority of yersiniosis cases pork is implicated (Ostroff et al, 1994).

A principal source of pathogenic yersinia, especially *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3 are pigs, which are carrying pathogen in their lymphatic tissues, especially in palatine tonsils at the age of slaughter. Due to cross-contamination from yersinia positive tonsils, pathogenic *Y. enterocolitica* may spread to pig carcasses at the slaughter (Fredriksson-Ahomaa et al., 2000). In contrast, non pathogenic yersinia species are distributed in the environment and are isolated from fresh water, fish and food samples, which can serve as a source of them to animals. Due to widespread occurrence of these yersinia in the environment, they can easily enter the

slaughterhouse with slaughtered animals and spread to carcasses of pigs during slaughtering procedures, indicating the hygiene status of certain plant (Harmon et al., 1984). As pathogenic yersiniae – *Y. enterocolitica* 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* were isolated from pigs in previous studies in Latvia with the prevalence 35 % and 3 %, respectively, (Terentjeva and Bērziņš, 2010), possible that they could spread from tonsils and to contaminate carcasses at the slaughter .

The aim of the present study was (i) to detect yersiniae species and/or their bioserotypes, distributed on pig carcasses and (ii) to evaluate differences in the prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersiniae depending on sampling site and slaughterhouse, where samples were collected.

## **MATERIAL AND METHODS**

A total amount of 90 surface swabs of pig carcasses were collected in three slaughterhouses - A, B and C, located in Zemgale, Vidzeme and Latgale. Samples were collected during July 2007 to November 2009. A total amount of 30 surface samples from each slaughterhouse were obtained. All slaughterhouses were large scale plants with slaughter capacity up to 50 pigs per hour. Slaughtering process included the following operations – stunning, bleeding, scalding, flaming, evisceration, carcass splitting, rinsing and cooling.

Carcass surface swabs were collected from pig carcasses after evisceration and splitting, but prior to *post-mortem* inspection. An area of approximately 20cm<sup>2</sup> of head and costal regions was swabbed with sterile gauze tampon (5 cm x 5 cm), moistured in 0.9% of saline, placed in sterile sample transporting bags and delivered to the laboratory on ice within 2 h after collection. Samples were diluted with 90 ml PMB broth (peptone-mannitol-bile salt broth) immediately after arrival to the laboratory.

Samples were tested using the direct plating, the selective enrichment and the cold enrichment according to the ISO and NMKL methods. Prior to testing, swabs in PMB and were left for one hour at 22°C for resuscitation. For the direct plating, 10µl of suspension were streaked on CIN Agar. For the selective enrichment, 0.1ml of suspension was transferred into ITC (Irgasan Ticarcillin Chlorate) enrichment broth (Fluka, Switzerland) and CIN agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar, Yersinia selective agar, OXOID, Basingstoke, Hampshire, UK) and incubated at 25°C for 48 h. For the cold enrichment, samples in PMB broth were plated out onto CIN agar after one, two and three weeks of incubation at 4°C with alkali treatment with 0.25% KOH in case no positive isolates were obtained during the first or second weeks of cold enrichment.

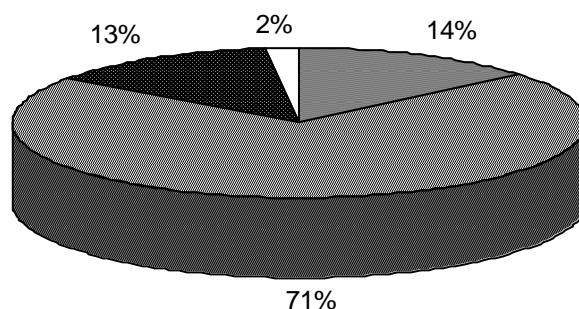
A quantity of 10µl of suspension from ITC broth after incubation, and PMB after cold enrichment was streaked onto CIN agar plates. CIN agar was incubated at 30°C for 48 h. CIN plates were evaluated after incubation in order to detect bacterial colonies with yersiniae-like appearance. Presumptive colonies with a “bull eye” like appearance - red centre and transparent surrounded margins, from CIN agar were tested for oxidase reaction and urea hydrolysis. Differentiation of species was carried out with API 20E system (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France).

Biotyping of *Y. enterocolitica* positive isolates was performed as follows: strains were tested for pyrazinamidase activity, salicin, xylose, trehalose fermentation and lipase hydrolysis as described by Wauters et al., (1987). Indole reaction was obtained from API 20E kit. Serotyping was carried out as described by the manufacturer with *Yersinia enterocolitica* O:3 antisera (Sifin, Berlin, Germany).

The Chi-square tests were used to detect differences in the prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersiniae on pig carcasses in different slaughterhouses.

## RESULTS AND DISCUSSION

Both non-pathogenic and pathogenic yersinia were isolated from slaughtered pig carcasses. From the isolated species or/and their bioserotypes *Y. enterocolitica* biotype 1A, *Y. kristensenii* and *Y. frederiksenii* belonged to non-pathogenic, while *Y. enterocolitica* 4/O:3 to pathogenic yersinia (Figure 1).



■ *Y. enterocolitica* 4/O:3 ■ *Y. enterocolitica* 1A ■ *Y. kristensenii* □ *Y. frederiksenii*

### 1. attēls. Jersīniju sugu izplatība cūku liemeņos

Figure 1. The prevalence of yersinia on pig carcasses

*Y. enterocolitica* 1A was the most frequently isolated from yersinia species, whereas *Y. frederiksenii* was isolated less frequently. In total, the percentage of isolated non-pathogenic species were significantly higher than percentage of pathogenic *Y. enterocolitica* 4/O:3 on pig carcasses.

Pig heads and costal region of the carcasses were found to be contaminated with *Yersinia* spp., there the highest prevalence of yersinia were observed on pig head, while the lowest on costal region (Table 1).

1.tabula/Table 1

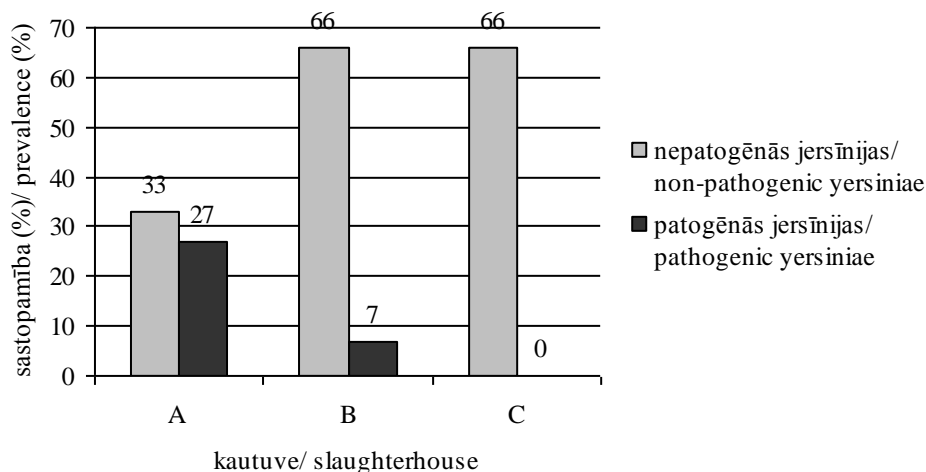
### Nepatogēno un patogēno jersīniju sastopamība cūku liemeņos The prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersinia on pig carcasses

Parauga noņemšanas vieta Sampling site	Paraugu skaits No. of samples	Pozitīvo paraugu skaits (%) No. of positive samples (%)	
		Nepatogēnās jersīnijas Non-pathogenic yersinia	Patogēnās jersīnijas Pathogenic yersinia
Galvas reģions Head region	45	25 (56)	5 (11)
Ribu reģions Costal region	45	22 (46)	3 (7)
Kopā/ Total	90	47 (52)*	8 (9)

\* the prevalence of non-pathogenic yersinia was significantly higher than the prevalence of pathogenic yersinia ( $p < 0.05$ )

In total, the prevalence of non-pathogenic yersinia on pig carcasses was significantly higher than pathogenic yersinia ( $p < 0.05$ ). However, we did not find significant differences in the prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersinia on

pig head and costal regions ( $p < 0.05$ ). The prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersiniae on pig heads varied depending on slaughterhouse, where samples were collected. Non-pathogenic yersiniae were observed in all three slaughterhouses, while pathogenic only in slaughterhouses A and B. The highest prevalence of non-pathogenic yersiniae was found in slaughterhouse C, but the lowest – in slaughterhouse B, 66% and 33% of positive cases, respectively (Figure 3). The highest prevalence of pathogenic yersiniae were observed in slaughterhouse A, but the lowest in slaughterhouse C, 27% and 0% of positive cases, accordingly.

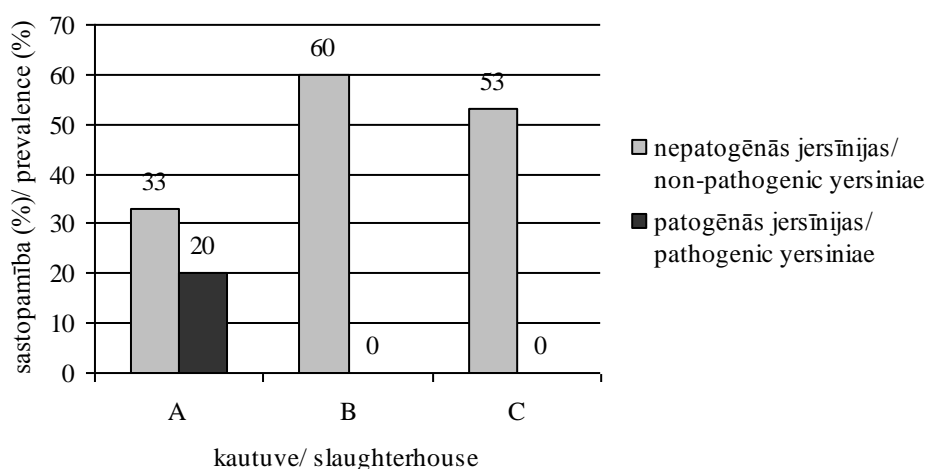


## 2.attēls. Jersīniju sastopamība cūku galvās dažādās kautuvēs

Figure 2. The prevalence of yersiniae in pig heads in different slaughterhouses

The prevalence of non-pathogenic yersiniae was significantly higher in slaughterhouse C, than in slaughterhouses A and B ( $p < 0.05$ ). In spite, the prevalence of pathogenic yersiniae, was significantly higher in slaughterhouse A, than in slaughterhouses B and C ( $p < 0.05$ ).

The prevalence of non-pathogenic and pathogenic yersiniae, isolated from costal region differed from slaughterhouse where samples were collected. Non-pathogenic yersiniae were observed in all three slaughterhouses, while pathogenic only in slaughterhouse A. The highest prevalence of non-pathogenic yersiniae was found in slaughterhouse B, but the lowest in the slaughterhouse A – 33% and 53%, respectively (Figure 3).



## 3.attēls. Jersīniju sastopamība ribu reģionā dažādās kautuvēs

Figure 3. The prevalence of yersiniae in costal region in different slaughterhouses

In total, the prevalence of non-pathogenic yersiniae in slaughterhouses B and C was significantly higher than in slaughterhouse A ( $p < 0.05$ ). In contrast, the prevalence of pathogenic yersiniae was significantly higher in slaughterhouse A, than in slaughterhouses B and C ( $p < 0.05$ ).

The isolation of non-pathogenic and pathogenic *Yersinia* species from the pig carcasses was in agreement with previous studies (Harmon et al., 1984, Fredriksson-Ahomaa et al., 2000, Bonardi et al., 2007, Laukkanen et al., 2009). However, the prevalence of non-pathogenic yersiniae in our study was higher than 1% of positive samples reported by Bonardi et al., 2007 and the prevalence of *Y. enterocolitica* 4/O:3 was higher than 0% and 6% of contaminated carcass reported by Bonardi et al., 2003 and Fredriksson-Ahomaa et al., 2000. These data indicate that yersiniae are widespread on pig carcasses in large scale slaughterhouses in Latvia, but serious concerns should be taken due to distribution of pathogenic yersiniae on them. As pigs are known to be the carriers of pathogenic yersiniae, especially *Y. enterocolitica* 4/O:3 in Latvia (Terentjeva, Bērziņš, 2010), the finding of same bioserotypes both in pig tonsils and pig carcasses, indicate that the source of this pathogen on pig carcasses of was pig tonsils.

## CONCLUSIONS

1. Non-pathogenic yersiniae were the most widely isolated in our study, indicating that carcasses were mainly contaminated from the outside environment or during processing due to insufficient hygiene procedures in the slaughterhouse.
2. High rates of isolation of *Y. enterocolitica* 4/O:3 from carcasses maybe due to tonsil tissues, which partially may remain on pig heads after splitting and remain surrounded tissues, because they often are carrying pathogen.
3. Finding of the same *Y. enterocolitica* bioserotypes 4/O:3 both in pig tonsils and pig carcasses, indicates that carcass became contaminated from pig tonsils.

## REFERENCES

1. Anonymous. Microbiology of food and animal feedings stuffs- Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273: 2003). – International Organization of Standartization. 2003; 1-15.
2. Anonymous. *Yersinia enterocolitica*. Detection in foods. Method no. 117, 3rd ed. - Nordic Committee on Food Analysis (NMLK), Espoo, Finland. 1996; 1-8.
3. Bonardi, S., Brindani, F., Pizzin, G., Lucidi, L., D'Incau M., Liebana E., Morabito S. Detection, of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Pigs at Slaughter in Italy. - International Journal of Food Microbiology. 2003;85: 101-110.
4. Bonardi, S., Paris, A, Bacci, C., D'Incau M, Ferroni L., Brindani F. Detection and characterization of *Yersinia enterocolitica* from pigs and cattle. - Veterinary Research Communications. 2007; 31: 347-350.
5. Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T., Korkeala, H. Contamination of carcasses, offal, and the environment with *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse. -Journal of Food Protection. 2000; 63: 31-35.
6. Harmon, M.C., Swaminathan, B, Forest J.C. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from porcine samples obtained from an abattoir. - Journal of Applied Bacteriology. 1984; 56: 421-427.



7. Laukkanen, R., Martinez, P. O., Siekkinen, K. M., Ranta, J., Maijala, R., Korkeala, H. Contamination of Carcasses with Human Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Originates from Pigs Infected on Farms. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009; 6(6): 681-688.
8. Ostroff, S.M., Kapperud, G., Huteagner, L.C., Nesbakken, T., Bean, N.H. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in Norway: a prospective case-control study. - *Epidemiology and Infection*. 1994; 112: 133-141.
9. Terentjeva, M., Bērziņš, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pigs in Latvia. - *Journal of Food Protection*. 2010; 73: 1135-1138.
10. Wauters, E., Kandolo, K., Janssens, M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. - *Contributions in Microbiology and Immunology*. 1987; 9: 14-21.

# PERSONALIZĒTA ANTIKOAGULANTU TERAPIJA KARDIOLOĢIJĀ

## INDIVIDUALIZED ANTICOAGULATION THERAPY IN CARDIOLOGY

**Inga Urtāne<sup>1</sup>, Jānis Ansabergs<sup>2</sup>, Aina Silvija Štokmane<sup>1</sup>, Dace Bandere<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Rīgas Stradiņa universitāte,

Rīga Stradins University,

<sup>2</sup>Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

Paul Stradins Clinical University Hospital, Latvia

[inga\\_ut@inbox.lv](mailto:inga_ut@inbox.lv) , [Aina.Stokmane@rsu.lv](mailto:Aina.Stokmane@rsu.lv), [Dace.Bandere@rsu.lv](mailto:Dace.Bandere@rsu.lv)

### ABSTRACT

No standard dosage of warfarin will work for all people or even for the same person in all situations. Dosing of this medication must be individualized.

**The purpose** was to investigate mechanisms of warfarin – drug interactions, identify possible warfarin interactions in the hospital drug prescribing for cardiologic patients.

In this study patients from cardiological department of the hospital were included who received warfarin therapy from May 2008 to September 2008.

A total of 100 patients (60 male, 40 female) met the study inclusion criteria. The mean age was 69 years. Patients received warfarin treatment for the following indications: atrial fibrillation (43 patients), tachyarrhythmia (29 patients), prosthetic valve (7 patients), dilated cardiomyopathy (21 patients).

Concomitant other drugs were analysed known either to prolong the prothrombin time or INR or to interact with warfarin. It is recommended that for patients who received combinations of warfarin with other drugs such as amiodarone ( 25%), anti-inflammatory drugs (aspirin (4%)), statins (13%), proton pump inhibitor (omeprazole (4%)) the daily warfarin dose is reduced to avoid increased bleeding risk.

### CONCLUSIONS

- Risk of warfarin – drug interactions were found for combined use with amiodarone, digoxin, statins, spironolactone, aspirin, omeprazole, thyroid hormones and antithyroid drugs.
- Physician and clinical pharmacist collaboration is important to recognize, analyze and manage potential warfarin – drug interactions during hospitalizations and if necessary prescribe other medications or adjust dose of warfarin.

**KEY WORDS:** warfarin, drug-drug interactions, anticoagulation, dose.

### INTRODUCTION

The number of elderly patients who are eligible to receive warfarin is steadily expanding, in part because of the increasing prevalence of atrial fibrillation. Both the risk of stroke in patients with atrial fibrillation and the risk of mortality in patients who experience a stroke increase with age. Warfarin therapy reduces the risk of stroke in patients with atrial fibrillation by 68%. It is highly effective for the treatment and prevention of venous and arterial thrombosis [10]. Synthetic coumarin derivate exerts

its anticoagulant effect by inhibiting the cyclic interconversion of vitamin K and thereby impeding the production of clotting factors in the liver [6]. Because of substantial interpatient differences in sensitivity to warfarin, numerous variables that can alter the response to therapy with time, and the potential risk for major hemorrhage, a systematic approach to therapeutic drug monitoring must be carried out for every patient who has anticoagulant therapy [1, 2]. Warfarin – drug interactions are often encountered in the care of elderly potentially causing hospital admission and death. These interactions can be divided into pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. Pharmacokinetic mechanisms of drug interaction with warfarin are mainly enzyme induction, enzyme inhibition, and reduced plasma protein binding. Pharmacodynamic mechanisms for interactions with oral anticoagulant are synergism (impaired hemostasis, reduced clotting factor synthesis), competitive antagonism (vitamin K), and an altered physiologic control loop for vitamin K (hereditary resistance to oral anticoagulants). The most serious interactions with warfarin are those that increase the anticoagulant effect and the risk of bleeding [3, 4]. By using the lowest possible required dose of warfarin, the physician can minimize the risk of bleeding while providing the benefits of anticoagulation.

Warfarin combine 3 unfavorable properties which make them prone to potentially life threatening drug - drug interactions: high plasma protein binding, cytochrome P450 dependent metabolism and narrow therapeutic range [6, 5, 7, 11]. It is important to pay attention when combinative therapy is appropriate.

**THE AIM** was to investigate mechanisms of warfarin – drug interactions, identify possible warfarin interactions in the hospital drug prescribing, define the effects of interactions on the warfarin maintenance dose for cardiologic elderly patients with an international normalized ratio target between 2.0 and 3.0.

## **MATERIALS AND METHODS**

In this study patients (age >65) from cardiologic department of the hospital were included who received warfarin concomitant with other drugs at the time from May 2008 to September 2008. In the questionnaire such facts from patient`s medical history as gender, age, indication for oral anticoagulant therapy, presence of other medical diagnoses, used drugs, values of International Normalized Ratio (INR) and dates of testing were summarized.

The warfarin dose was adjusted as necessary to maintain a therapeutic INR, which was defined in the majority of patients as an INR of 2 to 3. In a small subset of patients the INR was maintained between the ranges of 2.5 to 3.5. and 1.5 to 2.5 for valvular replacement and dilated cardiomyopathy indications, respectively.

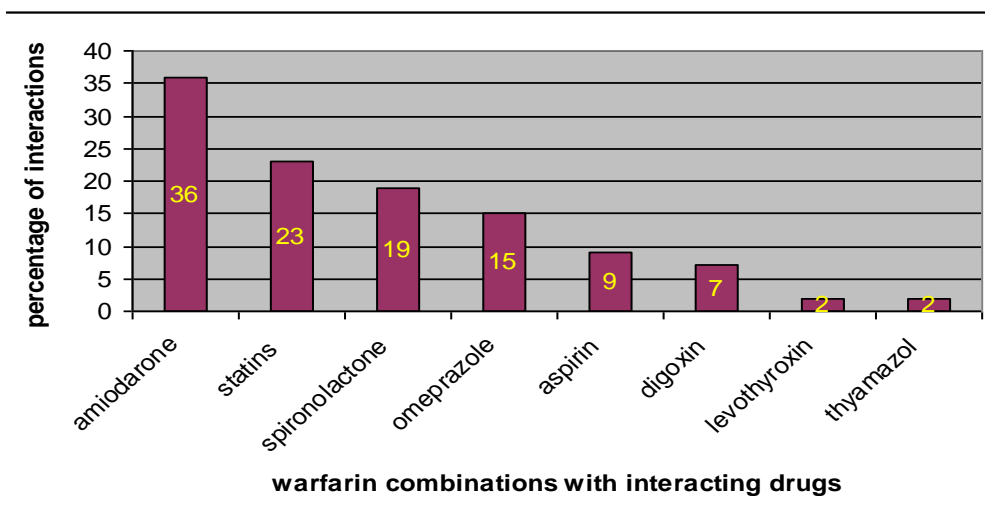
In statistical analysis comparisons of mean maximum percentage reductions in the warfarin dose observed during therapy of drugs which potentiate the anticoagulant effect of warfarin were performed using the Student`s *t* test. The level of statistical significance was defined as a *p* value <0.05; data are expressed as mean ± SD.

## **RESULTS**

A total of 100 patients (60 male, 40 female) met the study inclusion criteria. The mean age was 71 ± 6 years. Patients received warfarin treatment for the following indications: atrial fibrillation (n=43), tachyarrytmia (n=29), prosthetic valve (n=7), dilated cardiomyopathy (n=21).

Concomitant other drugs were analysed known either to prolong the prothrombin time or INR or to interact with warfarin. It is recommended that for patients who

received combinations of warfarin with other drugs such as amiodarone (25%), anti-inflammatory drugs (aspirin (4%)), statins (13%), proton pump inhibitor (omeprazole (4%)) the daily warfarin dose is reduced to avoid increased bleeding risk (Figure 1). In this study these combinations were found to be associated with a higher prevalence of hemorrhage compared with warfarin used alone.



1.attēls. Mijiedarbībā esošo medikamentu raksturojums stacionārā  
Figure 1. Drug Interactions with Warfarin in the Hospital

The major mechanisms of warfarin drug interactions are inhibition of metabolism, affection of bioavailability, protein binding (Table 1).

1. tabula/Table 1

**Medikamentu mijiedarbības iespējamo mehānismu apkopojums [8, 9]  
Mechanism of Selected Warfarin – Drug Interactions [8, 9]**

Mechanism of interaction	Examples
Inhibit the metabolism of warfarin	amiodarone (CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2) omeprazole (CYP2C19) statins (rosuvastatin, atorvastatin) (CYP2C9)
Displace warfarin from protein – binding sites	digoxin salicylates
Inhibit platelet aggregation	salicylates
Decrease or increase catabolism of vitamin K dependent clotting factors	thyroid hormones and antithyroid drugs
Diminish the ability of warfarin to prevent blood clots because the platelet cells and proteins are more concentrated after removal of sodium and water from the body	spironolactone

Patient's age, gender, other diseases such as diabetes, hypertension, liver diseases, impairment of coagulation system, history of bleeding, thyroid disorders may effect warfarin sensitivity resulting in increased or decreased warfarin requirements.

Safety of the anticoagulation in the elderly can be maximized through careful monitoring and maintenance of an INR between 2 and 3. Because warfarin dose requirements are known to decrease with age, the mean used starting dose of warfarin  $6.0 \pm 1.2$  mg/d ( $p < 0.001$ ) will likely result in supratherapeutic INR values ( $>3.5$ ) for many elderly ( $n=31$ ). 27 patients with INR value  $>3.5 \pm 0.2$  received concomitant amiodarone maintenance dose 200 mg/d. This interaction has been described in literature. Amiodarone strongly potentiates the anticoagulant effects of warfarin, resulting in prolongation of the INR. In this study we found inverse correlation between starting dose of warfarin and maintenance dose of amiodarone ( $r^2 = 0.94$ ,  $p < 0.005$ ). With a 32% mean maximum reduction in the warfarin dose being required by the study population at 8 weeks after concomitant warfarin and amiodarone therapy (200mg/d). Although a therapeutic INR was maintained throughout the study period, minor bleeding (nose or gum bleeding) occurred in five patients (5%). No major hemorrhagic episodes were observed in the study population.

In other cases of potential drug interactions we could not find any statistic significant correlations between the warfarin dose and supratherapeutic INR in our study.

On the basis of the available literature all these types of interactions are easily managed by INR monitoring which is required during the initiation or discontinuation of the medications.

## **DISCUSSION**

Many coexisting factors – mechanism of action, pharmacokinetic, pharmacodynamic properties of warfarin, indications, administration, dosage, adverse effects, withdrawal of oral anticoagulant could facilitate prescribing decisions and assist with appropriate monitoring to avoid serious adverse reactions. The mechanism for increased sensitivity to warfarin with aging is not well-understood. Factors such as hypoalbuminemia (leading to reduce volume of distribution), decreased dietary vitamin K intake (resulting in a decreased capacity to synthesize functional clotting factors), reduced absorption of vitamin K, and polypharmacy (producing drug-drug interactions that potentiate warfarin) may lead to increased warfarin sensitivity for an individual patient. The pharmacokinetics of warfarin do not explain the lower dose requirements, because the distribution and elimination half-lives of warfarin change very little with advancing age.

Warfarin-related adverse drug events have significant consequences in the form of bleeding events and associated hospital admissions. The frequency of monitoring and skilful dose adjustment is widely believed to be a significant factor in the success of warfarin therapy.

## **CONCLUSIONS**

1. Coumadin derivates (warfarin) combine 3 unfavourable properties, which make them prone to potentially life threatening drug – drug interactions:
  - high plasma protein binding
  - cytochrome P450 dependent metabolism
  - narrow therapeutic range

2. Warfarin plays a significant role in the prevention and treatment of thromboembolic disease among elderly. Elderly patients (age >65 years) are more sensitive to warfarin therapy.
3. Drug interactions and adverse drug reactions increase with increasing numbers of medications prescribed and represent a complex interplay of age, underlying disease, and number and types of medications. The clinical caveats in the elderly include reduced starting doses, elimination of unnecessary medications and anticipating and monitoring for drug interactions, especially when prescribing warfarin and amiodarone.
4. Risk of warfarin – drug interactions was found for combined use with amiodarone, digoxin, statins, spironolactone, aspirin, omeprazole, thyroid hormones and antithyroid drugs.
5. Safety of the anticoagulation in the elderly can be maximized through careful monitoring and maintenance of an INR between 2 and 3.
6. The importance of patient education cannot be overstated. The patient must have an appreciation of the potential for adverse consequences due to other medications or alternative therapies used with warfarin. The clinical pharmacist with other health providers can offer reminders of signs of bleeding, emphasize vigilance in disclosing the usage of nonprescription remedies, promote diligence in medication adherence, and encourage adherence to regular INR monitoring.
7. Physician and clinical pharmacist collaboration is important to:
  - recognize, analyze and manage potential warfarin – drug interactions during hospitalizations
  - prescribe other medications or change doses of warfarin based on changes of INR.

## FOOTNOTES

Abbreviations: INR = international normalized ratio

## REFERENCES

1. Ansell, J., Hirsh, J., Poller, L. et al. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: The Seventh ACCP Conference of Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. – Chest. 2004; 126: 2045- 2335.
2. Bennet, P.N., Brown, M.J. Clinical Pharmacology. 9<sup>th</sup> ed. – Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003; 567- 573.
3. Chakrabarti, R., Das, S.K. Advances in Antithrombotic Agents. - Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry. 2007; 5: 175– 185.
4. Dentali, F., Douketis, J.D., Lim, W. et al. Combined aspirin – oral anticoagulant therapy alone among patients at risk for cardiovascular disease: a meta – analysis of randomized trials. – Arch Intern Med. 2007; 167(2): 117– 124.
5. Edwards, L.D., Fletcher, A.J., Fox, A.W., Stonier, P.D. Principles and Practice of Pharmaceutical Medicine. 2<sup>nd</sup> ed. – England: John Wiley & Sons Ltd, 2007; 193-203.
6. Hirsh, J., Dalen, J.E., Anderson, D.R. et al. Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. – Chest. 2001; 119(1): 8– 21.
7. Katzung, B.G. Basic and Clinical Pharmacology. 10<sup>th</sup> ed. - United States of America, 2007; 549- 552.
8. Kurnik, D., Loebstein, R., Farfel, Z. et al. Complex drug – drug – disease interactions between amiodarone, warfarin, and the thyroid gland. - Medicine

- (Baltimore). 2004; 83(2): 107- 113.
9. Lu, Y., Won, K.A., Nelson, B.J. et al. Characteristics of the amiodarone – warfarin interaction during long – term follow – up. - *Am J Health Syst Pharm*. 2008; 65(10): 947- 952.
  10. Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C. *Pharmacology*. 2<sup>nd</sup> ed. – United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 199- 201.
  11. Zhang, K., Young, C., Berger, J. Administrative claims analysis of the relationship between warfarin use and risk of hemorrhage including drug – drug and drug – disease interactions. - *J Manag Care Pharm*. 2006; 12(8): 640– 648.

# BENZO(A)ANTRACĒNA, BENZO(A)PIRĒNA, BENZO(B)FLUORANTHĒNA UN KRIZĒNA SATURSKŪPINĀTĀ GAĻĀ UN ZIVĪS

## CONTENT OF BENZO(A)ANTHRACENE, BENZO(A)PYRENE, BENZO(B)FLUORANTHENE AND CHRYSENE IN SMOKED MEAT AND FISH

**Anda Valdovska<sup>1</sup>, Jānis Mičulis<sup>2</sup>, Ligita Plotiņa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>2</sup> Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvija

Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”, Latvia

[Anda.Valdovska@llu.lv](mailto:Anda.Valdovska@llu.lv), [sigra@lis.lv](mailto:sigra@lis.lv)

### ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are widespread contaminants representing an important group of mutagens and carcinogens that have been detected in various foods – cereals, oils, fats, smoked meat and fish products. The contents of the PAH4 were analyzed from traditionally smoked fish and meat products using method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The highest mean content of PAH4 was detected in canned smoked sprats (50.43 µg/kg). The analyzed smoked meat products showed mean content of PAH4 – 2.6 µg/kg and smoked fish products without smoked sprats mean content of PAH4 – 5.4 µg/kg. The results of our research confirms that maximum permissible limit of PAH4 for canned smoked sprats shall be establish higher in comparison with other smoked fish products.

**KEY WORDS:** polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, smoked fish, smoked meat.

### IEVADS

Zivju un gaļas tradicionālā kūpināšana koksnes nepilnīgas sadegšanas jeb pirolīzes radītajos dūmos ir sens pārtikas sagatavošanas veids. Gaļas un zivju kūpināšana aizkavē mikroorganismu attīstību produktos, piešķir tiem specifiskas garšas, krāsas un smaržas īpašības. Kūpināšanas laikā zivju un gaļas produkti zaudē mitrumu un piesātinās ar dūmu sastāvdaļām – formaldehīdiem, spirtiem un etiķskābi, kam piemīt baktericīdas īpašības, kā rezultātā paildzinās produktu derīguma termiņš (Bauer, 2004). Koksnes pirolīzes radītajos dūmos konstatē ap 200 dažādu ķīmisko savienojumu grupu, t.sk., policikliskos aromātiskos ogļūdeņražus (PAO).

PAO ir liela nepolāro organisko savienojumu grupa, kas satur divus vai vairākus aromātiskos gredzenus ar oglekļa un ūdeņraža atomiem. Bez koksnes pirolīzes PAO veidojas arī rūpniecisko procesu laikā un ar izmešiem nonāk atmosfērā. Savukārt ar nokrišņiem PAO nonāk apkārtējā vidē (Kulkarni, Mehendale, 2005). PAO konstatē ūdenī, gaisā, augsnē, augos, zivīs un citos jūras produktos, kā arī dažādos pārtikas produktos – graudaugu produktos, eļļās, taukos, kūpinātos gaļas un zivju produktos, kūpinātā sierā, kā arī tējā un kafijā.

Gaļas un zivju kūpināšanas laikā PAO saturošas dūmu cietās daļiņas adsorbējas uz produktu virsmas un caur to difundē produktā (Kulkarni, Mehendale, 2005). Saistītais PAO saturs kūpinātos gaļas un zivju produktos atkarīgs no daudziem kūpināšanas



faktoriem – kurināmā sadegšanas temperatūras, kūpināšanas ilguma, kūpināšanas krāsns tipa un kurināmā tipa un mitruma (Ogbadu, 2000; Bauer, 2004). Salīdzinot dažādu kūpināšanas tehnoloģiju pielietojumu, noskaidrots, ka augstus PAO līmeņus iegūst, pārtiku kūpinot ar tiešās kūpināšanas paņēmienu, t.i., kūpināšanas kamerā sadedzinot kurināmo tieši zem pārtikas produktiem, kā rezultātā dūmgāzes un karstais gaiss tiešā veidā nonāk kontaktā ar pārtiku (Karl, Leinemann, 1996).

Kopumā ir konstatēti aptuveni 660 PAO, tomēr Pārtikas Zinātniskā komiteja (SCF) un ANO Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (FAO) un Pasaules Veselības organizācijas (WHO) Ekspertu komiteja par pārtikas piedevām (JECFA) ir atzinusi 15 PAO savienojumus par īpaši kancerogēniem, mutagēniem un genotoksiskiem dzīvniekiem un cilvēkam (JECFA, 2005). Savukārt no tiem par viskaitīgāko cilvēka veselībai ir atzīts benzo(a)pirēns (BaP), kas šobrīd tiek izmantots par PAO pārtikas piesārņojuma marķieri (Sanders, Wise, 1997). Tomēr Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes (EFSA) eksperti uzskata, ka BaP nav atbilstošs PAO grupas marķieris un tādēļ rekomendē izmantot benzo(a)pirēna, krizēna, benzo(a)antracēna un benzo(b)fluorantēna summu jeb PAO4 kā PAO piesārņojuma raksturotāju (EFSA, 2008).

Pētījumā veikta Latvijā ražotu tradicionāli kūpinātu gaļas un zivju produktu PAO4 līmeņa testēšana un sniegts PAO4 datu salīdzinošais izvērtējums.

## **MATERIĀLS UN METODIKA**

PAO līmenis tika noteikts 9 kūpinātas gaļas un 10 kūpinātu zvejas produktu paraugos. Pētījumam paraugus ieguvām pārtikas uzņēmumos, kas izmanto iespējami vienādu kūpināšanas tehnoloģiju, t.i., strādā ar tradicionālo kūpināšanas metodi, dūmu ieguvei izmantojot alkšņu malkas šķeldu.

Paraugu ņemšanu veicām saskaņā ar Komisijas 2007. gada 28. marta Regulas (EK) Nr. 333/2007 prasībām, ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes metodes svina, kadmija, dzīvsudraba, neorganiskās alvas, 3-MHPD un benzo(a)pirēna koncentrācijas oficiālajai kontrolei pārtikas produktos.

PAO4 testēšana veikta LLUZI „Sigra” bioķīmijas laboratorijā, un tika izmantota šķidrums hromotgrāfijas (AEŠH) metode. paraugu sagatavošana tika veikta sekojošos etapos:

- parauga homogeizēšana un pārziemošana ar kālija hidroksīda/metanola šķīdumu un ekstrakcija ar cikloheksānu
- cikloheksāna šķidrums- šķidrums ekstrakcija ar N, N-dimetilformamīda (DMF)/ūdens šķīdumu(9:1)
- kombinētā DMF slāna ekstrakcija ar cikloheksānu
- cikloheksāna fāzes mazgāšana ar ūdeni
- ekstrakta ietvaicēšana izmantojot rotācijas ietvaicētāju un atšķaidīšana cikloheksānā
- ekstrakta attīrīšana izmantojot silikagela cietās fāzes ekstrakcijas kolonnu
- ekstrakta ietvaicēšana un atšķaidīšana kustīgajā fāzē (acetnitrils/ūdens)
- ekstrakta analīze

## **REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

Pētījumā noteikts PAO4 daudzums kūpinātos zivju un gaļas produktos (skat. 1.tab.), jo, kā zināms, zivīs un jūras bezmugurkaulniekos no apkārtējās vides salīdzinoši maz absorbējas PAH (Stolyhwo, Sikorski, 2005).

**Vidējais PAO4 saturs kūpinātos gaļas un zivju produktos**  
**Average content of PAH4 in smoked meat and fish products**

Paraugu veids Type of samples	BaP, µg/kg / LV	BaP, µg/kg / EFSA	CHR, µg/kg / LV	CHR, µg/kg / EFSA	BaA, µg/kg / LV	BaA, µg/kg / EFSA	BbF, µg/kg / LV	BbF, µg/kg / EFSA	PAO4, µg/kg / LV PAH4, µg/kg	PAO4, µg/kg / EFSA PAH4, µg/kg
	Kūpināti gaļas produkti Smoked meat products	0.6 9	0.2 0	0.5 3	0.5 0	0.6 8	0.4 2	0.7 0	0.1 0	2.60
Kūpināti zivju produkti Smoked fish products	3.1 4	0.2 9	8.1 0	0.7 5	9.7 6	0.5 6	2.7 0	0.3 0	23.7 0	1.90

BaP - Benzo(a)pirēns, Benzo(a)pyrene

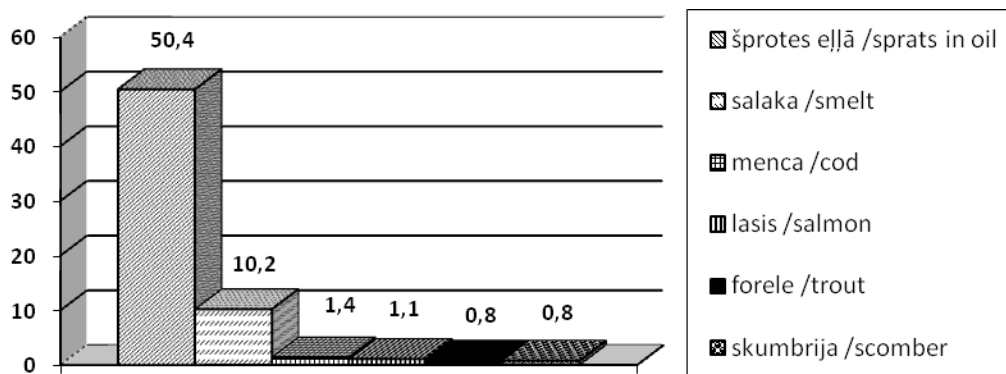
CHR - Krizēns, Chrysene

BaA - Benzo(a)antracēns, Benzo(a)anthracene

BbF - Benzo(b)fluorantēns, Benzo(b)fluoranthene

Salīdzinot mūsu pētījuma rezultātus ar EFSA PAO4 datiem, redzam, ka kūpinātu gaļas produktu grupā EFSA vidējie dati ir 2.1 reizes zemāki, turpretim daudz būtiskāka atšķirība ir rādītājam kūpinātu zivju produktu grupā. Dažādu kūpinātu zivju produktu vidējie PAO4 rādītāji (µg/kg) redzami 1.attēlā.

No 1.attēla redzams, ka kūpinātās šprotēs ir ievērojami augstāks vidējais PAO4 līmenis- 50.4 µg/kg salīdzinot ar vidējo rādītāju pārējos kūpināto zivju produktos, t.i., 5.4 µg/kg. Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde, apkopojot datus par 336 kūpinātu zivju un 562 kūpinātas gaļas paraugiem, arī ziņojusi par benzo(a)pirēna, krizēna, benzo(a)antracēna un benzo(b)fluorantēna līmeņiem (EFSA, 2008), taču vidējais PAO4 saturs mūsu pētījumā kūpinātās šprotēs 26.5 reizes pārsniedz EFSA vidējos PAO4 rādītājus šajā zivju produktu kategorijā. Atsevišķu PAO4 komponentu analīze kūpināto šprotu kategorijā parādīja, ka benzo(a)pirēna, kas šobrīd ir PAO piesārņojuma indikators ES normatīvajos aktos, vidējais piesārņojums ir 6.72 µg/kg jeb 23.2 reizes augstāks nekā EFSA datos, krizēna piesārņojums vidēji ir 17.3 µg/kg jeb 23 reizes augstāks, benzo(a)antracēns – 21.5 µg/kg jeb 38.4 reizes augstāks un benzo(b)fluorantēns – 5.63 µg/kg jeb 18.7 reizes augstāks nekā EFSA datos.



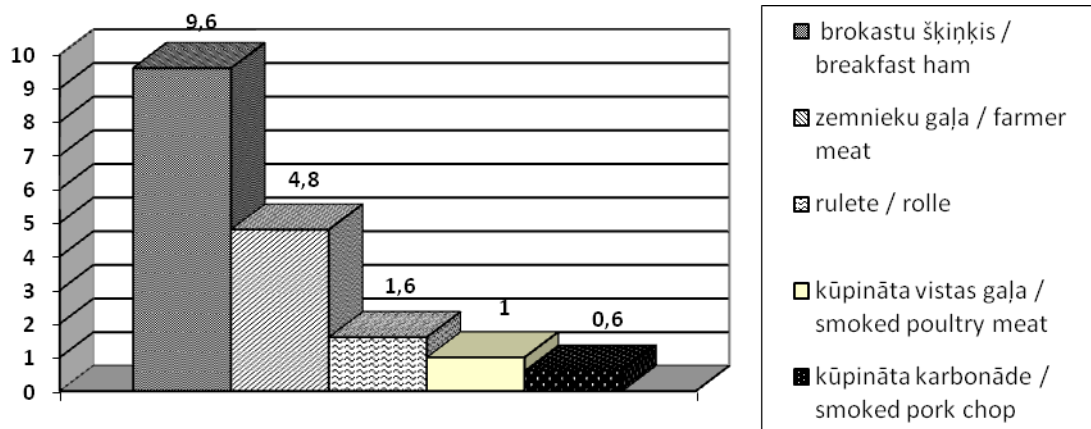
1.attēls. PAO4 daudzums kūpinātu zivju produktos  
Figure 1. Content of PAH4 in smoked fish products

Kūpinātu šprotu konservu ražošanā tradicionāli izmanto Baltijas jūras brētliņas ar ķermeņa garumu līdz 120 mm. Pētnieki (Casini et al., 2006) ziņo par būtiskām izmaiņām Baltijas jūras ekosistēmā pēdējo 15 - 20 gadu laikā, kā rezultātā ir pasliktinājusies zivju, t.sk., brētliņu barības bāze, kas negatīvi ietekmē zivju biomasas pieaugumu. EFSA pētījumi (2008) liecina, ka PAO difūzija kūpinātā produkta iekšienē notiek caur produkta virsmu, tādēļ augsto PAO līmeni kūpinātām šprotēm skaidrojam ar relatīvi lielu brētliņas ķermeņa virsmu un vienlaikus nelielu zivs svaru, turklāt brētliņām ir salīdzinoši plāna āda, kas mazāk aizkavē PAO nokļūšanu zivīs. Izvirzīto hipotēzi apstiprina mūsu iegūtie dati par PAO4 saturu kūpinātās salakās, kas izmēra ziņā ir tuva brētliņām. Vienlaikus mūsu dati par PAO4 saturu salīdzinoši liela izmēra kūpinātās zivīs (mencā, lasī, forelē un skumbrijā) neatšķiras no EFSA vidējiem datiem iepriekšminētajām zivīm.

EK Regulas projekts, kas grozīs Regulu Nr.1881/2006, plāno iespējamo maksimāli pieļaujamo normu kūpinātiem zivju produktiem – benzo(a)pirēnam 5.0 µg/kg un PAO4 summai 25.0 µg/kg. Mūsu pētījums parāda, ka tradicionāli kūpināti šprotu konservi neatbilst EK Regulas projektā piedāvātajām normām kūpinātu zivju produktiem. Tādēļ tradicionāli kūpinātām šprotēm nepieciešams noteikt augstāku maksimāli pieļaujamo piesārņojuma līmeni nekā pārējiem kūpinātu zivju produktiem.

Izvērtējot PAO4 saturu kūpinātos gaļas produktos (2.att.), konstatējām, ka visaugstākais tas ir „kūpinātā brokastu šķiņķī” (9.6 µg/kg), bet viszemākais – „kūpinātā karbonādē” (0.6 µg/kg). Vācijas zinātnieki (Jira, 2010) turpretim kūpinātam šķiņķim konstatējuši viszemāko PAO4 līmeni (0.1 µg/kg), kaut gan vidējais PAO4 līmenis visos izmeklētajos kūpinātās gaļas produktos bija 0.6 µg/kg, bet augstākais – tikai 0.58 µg/kg („Frankfurtes desiņām”). Tātad mūsu pētījumā vidējais PAO4 līmenis ir par 77 % augstāks nekā Vācijas dati.

Salīdzinot mūsu pētījumā iegūtos PAO4 datus ar EFSA rezultātiem (2008), redzam, ka EFSA vidējie rādītāji ir 2.1 reizi zemāki nekā mūsu. PAO4 rezultātus varētu skaidrot ar atšķirībām dažādu valstu kūpināšanas tehnoloģijās, sevišķi kūpināšanas ilgumā un kurināmā gruzdēšanas temperatūrā, jo tie ir noteicošie faktori PAO piesārņojumam tradicionāli kūpinātos gaļas un zivju produktos (EFSA, 2008; Jira, 2010).



2.attēls. PAO4 daudzum kūpinātos gaļas produktos  
Figure 2. Content of PAH4 in smoked meat products

### SECINĀJUMI

1. Latvijā ražoto tradicionāli kūpināto gaļas un zivju produktu vidējais PAO4 līmenis veiktā pētījuma ietvaros ir augstāks par EFSA datiem, attiecīgi 2.1 un 12.5 reizes
2. PAO4 līmenis Latvijas tradicionāli kūpinātos gaļas un zivju produktos (izņemot kūpinātu šprotu konservus) atbilst Eiropas Komisijas Regulas projektā plānotajām PAO4 maksimāli pieļaujamajām piesārņojuma normām.

### LITERATŪRA

1. Bauer, F. Residues Associated with Meat Production. In: Encyclopedia of Meat Sciences (ed. Jensen et al.) - Elsevier, Oxford: UK, 2004; 1189 -1190.
2. Casini, M., Cardinale, M., Hjelm, J. Inter-annual variation in herring, *Clupea harengus*, and sprat, *Sprattus sprattus*, condition in the central Baltic Sea. - Synthesising ecology. 2006; 112 (3): 481 – 715.
3. JECFA. Summary and conclusion of the Joint FAO/WHO Ekspert Committee on Food Additives, 64th meeting, Rome, 8-17 February 2005.
4. Jira, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in German smoked meat products. - Europe Food Research Technology. 2010; 230: 447 - 455.
5. Karl, H., Leinemann, M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in smoked fishery products from different smoking kilns. - Z.Lebensm. Unters. Forsch. 1996; 202: 458 - 464.
6. Komisijas 2006. gada 19. decembra Regula (EK) Nr. 1881/2006, ar ko nosaka konkrētu piesārņotāju maksimāli pieļaujamo koncentrāciju pārtikas produktos. Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis. L 364/5.
7. Komisijas 2007. gada 28. marta Regula (EK) Nr. 333/2007, ar ko nosaka paraugu ņemšanas un analīzes metodes svina, kadmija, dzīvsudraba, neorganiskās alvas, 3-MHPD un benzopirēna koncentrācijas oficiālajai kontrolei pārtikas produktos. Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis. L 88/29.
8. Kulkarni, S. G., Mehendale, H. M. Benzo(a)pyrene. In: Encyclopedia of Toxicology, (ed. Wexler), Elsevier, Oxford: UK, 2005; 257 - 259.

9. Ogbadu, L. J. Traditional Preservatives–Wood Smoke. In: Encyclopedia of Food Microbiology (ed. Robinson et al.), Vol. 3, Academic Press: San Francisco, 2000; 1737 - 1743.
10. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. - The EFSA Journal. 2008; 724: 1 - 114.
11. Sanders, L., Wise, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons index. NIST special publication 922, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg. 1997.
12. Stolyhwo, A., Sikorski, Z. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review. - Food Chemistry. 2005; 91: 303 - 311.

# ANIMALS' BEHAVIORAL DATA ANALYSIS BASED ON BEHAVIOR PARAMETERS VISUALIZATION AND FRACTAL DIMENSION METHOD

**Viktor Veliks<sup>1,2</sup>, Alexander Grakovski<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>University of Latvia, Faculty of Biology, Department of Human and animals physiology, Latvia,

<sup>2</sup>Transport and Telecommunication Institute, Department of Electronic and Telecommunication, Latvia

[viktor.veliks@inbox.lv](mailto:viktor.veliks@inbox.lv)

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop advanced method of animals' behavior data representation which combined different behavior parameters and time-depending variation of these parameters.

Experimental data from animals' observation in round open field were used for the analysis. The following behavior parameters data were used for calculations – distance, presence in zones and different animal's positions. Data preparation for zones and positions was done using specific coding procedure. A 3-D array was created and thereafter used for manipulations.

In the first step of our algorithm 3-D plot of observation data was calculated, this gave possibility to conduct visual data analysis. In the second step Euclidean points from 3-D array were calculated and obtained time series data. Finally, fractal dimension was calculated from time series. We observed that animals with low behavior activity had lower fractal dimension values.

**KEY WORDS:** behaviour, rats, fractal dimension, calculation method.

## INTRODUCTION

During statistical analysis of behavioral data it is important to look on behavior as a complex process during observation period. Usually analysis of aggregated observation data (typically by mean or sum values) is conducted using standard statistical procedures usually Student t-test and/or analysis of variance. Nonetheless in some cases variation of the behavior parameters during experiment is “masked by mean value”, another disadvantage of such way of analysis is that measured behavior parameters are looking “unrelated”. Combination of two factors – measured parameters changes in time and interaction between observed parameters seem allow to take different behavior picture. Using fractal dimension mathematical apparatus may solve this task (4). Different fractal dimension methods are widely used in biological research.

The fractal dimension calculations were used in a research on the influence of the electromagnetic field on movements of a *C.elegans* nematode. After two-day exposition of the electromagnetic field (900 MHz 100V/m) the nematodes were video recorded for 10 minutes. The obtained pictures with the nematode's movements in the Petri container were analyzed with 2.5-minute periodicity. It was observed that the fractal dimension of the electromagnetic field changes from 1.36 to 1.44, while for the group not under the influence it changes from 1.35 to 1.58, which means more movement activity (1).

The work by Nams is very interesting, in which he develops methodology for detecting animal movement track dependence from external environment (field, field

with a few trees or bushes, forest). If conditions change, also the movement tactic of an animal changes, which is represented in the line segment length used for the calculation of the fractal dimension (5). His methodology is turned to comparison of the obtained under different conditions distance FD values using dispersion analysis, thus getting much more precise characterization of the behaviour. For example, a life areal of a field mouse *C.gapperi* is approximately 50x50m<sup>2</sup> and the FD value of covered 50 m in this area was 1.11 – almost straight. However after using the VFractal method it turned out that the animal movement is best characterized by calculation step from 10 to 50 cm, biological interpretation of these results are the following: although the animal moves between two points as straight as possible, it tries to go round all obstacles.

Foss group (2) examine time variability of fluctuations of spontaneous pain in patients suffering from chronic back pain and chronic post-herpetic neuropathy, and contrast properties of these ratings to normal subjects' ratings of either acute thermal painful stimuli or of imagined back pain. They observed that the fluctuations of spontaneous pain do not possess stable mean or variance, implying that these time-series can be better characterized by fractal analysis, applying time and frequency domain techniques to characterize variability of pain ratings with a single parameter - fractal dimension. Observed correlation between fractal dimension for pain ratings and for brain activity, in chronic back pain patients using fMRI.

The aim of this study was to develop advanced method of animals' behavior data representation which combined different behavior parameters and time-depending variation of these parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

Experimental data from animals' observation in round open field were used for the analysis. Animals' behavior was recorded using SMART software (v 1.2, Barcelona, Spain). The following behavior parameters data were used for calculations – distance, presence in zones and different animal's positions. Values of these parameters were calculated for each second.

Our procedure for data analysis contain following steps – behavior parameters encoding, 3-D array creation and data visualization, calculation of time series from 3-D array and calculation of fractal dimension value. The special application in Matlab was developed for calculation of fractal dimension using correlation dimension formula from Grassberger and Procaccia (3) paper see Equation 1.

First step, encoding of the behavior parameters. Data preparation for zones and positions was done using specific coding procedure. Presence in a zone and directions of zone changing were coded by positive numbers.

For activities in zones, a graph of possible animals' movements was used. Encoding, longer distance covered by the animal from one zone to another in a round open field is given higher value. In the graph the first number represents movement in the round open field zones, see Figure 1. For example, 131 means that animal stayed in zone 1 then moved in to the zone 3 (center of open field) and returned back in to zone 1. Second number shows value that encodes this movement. Animal's positions were coded with negative numbers for scratching and grooming parameters and with positive numbers for vertical activities, holes observations and walking.

Behavior position was recoded using the following values: any vertical position 30 points, holes investigation 15, and walking 0 points, scratching -15 and grooming -30 points.

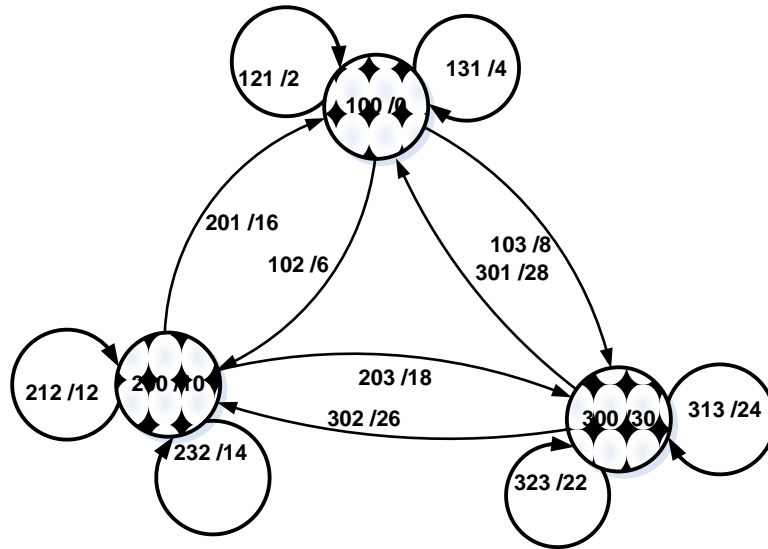


Figure 1. **Graph of animal movements in the open field zone; first number movement in the zones, second number coding value for this movement**

Second step, 3-D array was created and thereafter used for manipulations. We assume that parameters that describe behavior have the same weight. Values of movements in zones and behavior position were divided by mean value of walking distance, as a result all scales that represent animal behavior are equal and describe animal individually. The main reason for the 3-D array creation was only human perception limit; from mathematical point of view there is no limit for adding another dimension (behavior parameter) to the array.

Also in this step 3-D plot (presence in zones, animal positions and distance covered) of observation data was calculated, this gave the possibility to conduct visual data analysis. In figures 2 and 3 there are 3-D plots showing two animals' summary of behavior activities comparing to their movement track recorded during the experiment. Each point in 3-D plot represents behavior activity by values of animal positions, zones and distance covered during interval of one second. Figure 2 displays an animal behavior data with a low movement activity. A figure (2.b.) of relatively simple animal behavior phase with one pike on the zone axes can be seen that characterizes the animal entrance in the second zone (2.a.). During the experiment this animal was also less active in parameters of position and covered distance.



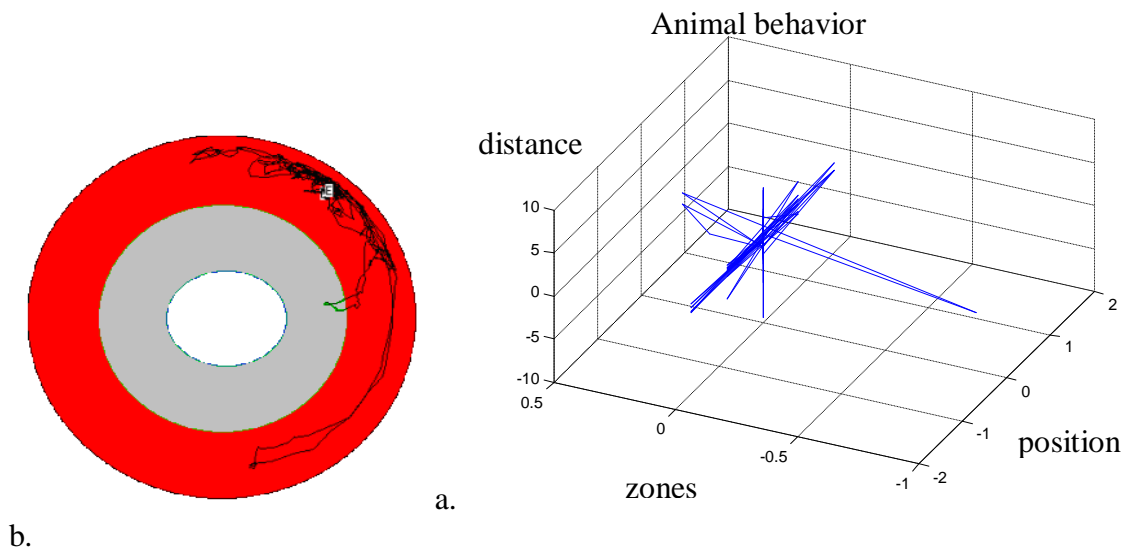


Figure 2. **Animal with low behavior activity: a. walking path in open field zones, b. 3-D plot of animal behavior**

Figure 3 displays an animal behavior with a very high movement activity. Figure (3.b.) of the behavior phase is already considerably different, the animal actively investigates the territory and even crosses the center of the open field (3.a.) and its behavior is much more varied.

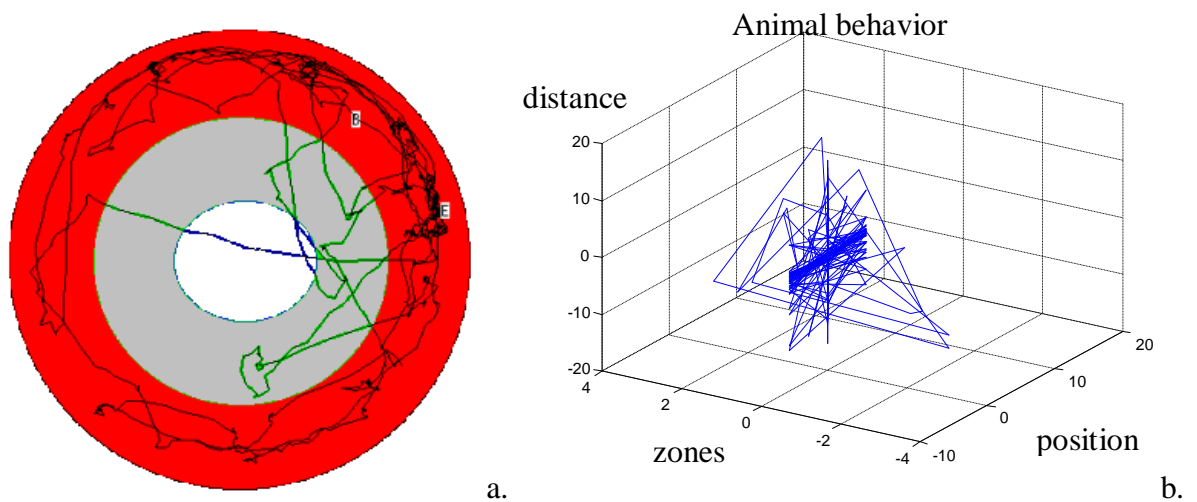


Figure 3. **Animal with high behavior activity: a. walking path in open field zones, b. 3-D plot of animal behavior**

In the third step Euclidean points from the 3-D array were calculated. As a result of this manipulation we obtained integrative behavior time series line. These data were used for calculation of value of “correlation dimension”. Figure 4.a. displays examples of plots of the data from the 3-D array and Figure 4.b. represents the calculated time series line.

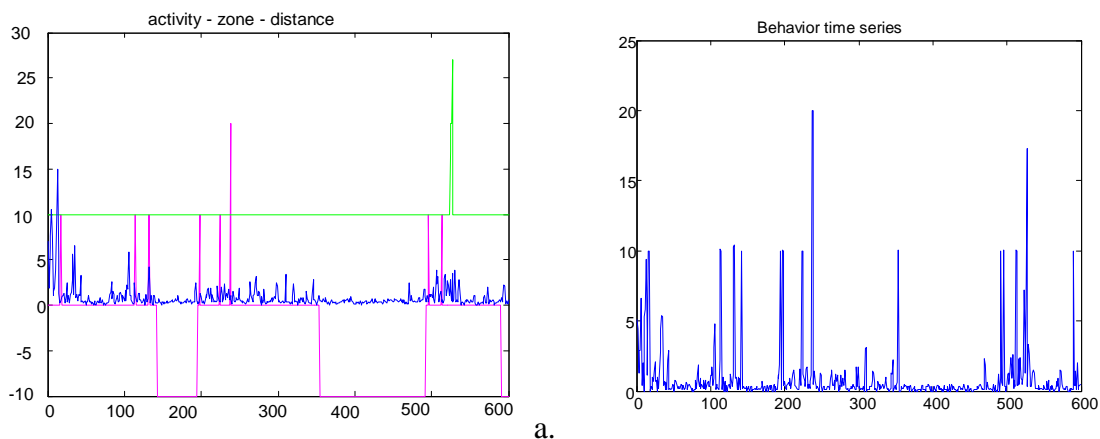


Figure 4. **Animal behavior parameters: a. plot of the 3-D array, b. plot of the behavior time series**

In the last step calculation of the fractal dimension value took place. We assumed that correlation dimension represents complexity of animal behavior. Mathematical equation for calculation of the correlation dimension –  $D_{cor}$  is the following:

$$D_{cor} = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\ln C(r)}{\ln r}, \text{ where } C(r) = \frac{\|X_i - X_j\| \leq r}{n^2} \quad (1)$$

where,  $r$  – length of square side,  $\|X_i - X_j\| \leq r$  – distance between points which are lower or equal to  $r$ ,  $n$  – number of points in the experimental data and  $D_{cor}$  – correlation dimension.

Besides, the length of line segment used for the calculations –  $r$  was taken from the data of animal movements: from the minimal value to the maximal. This method allows using biologically significant step sizes. For fifty  $r$  values logarithms were generated, starting with logarithm of minimal to logarithm of maximal value of the covered distance, in order to gain maximally even data representation on the graphic scale. Finally, fractal dimension was calculated. After finding  $\ln C(r)$  and  $\ln r$  values, correlation dimension  $D_{cor}$  was calculated using regression analysis where  $D_{cor}$  is a coefficient in the regression equation.

## RESULTS AND DISCUSSION

We observed that animals with low behavior activity had lower correlation (fractal) dimension values. For example, less active animal correlation dimension  $D_{cor}$  value is 0.33264 and for more active animal  $D_{cor}$  is 0.59863. That means that animal with low behavior activity (short covered distance, zones and taken positions) has also the simplest behavior patterns.

Obtained fractal dimension values may be investigated by standard statistical observation method, for example, by visual method, correlation or clusterization.

There are some advantages of our method, like new behavior data visualization technique, that allows making simple animal classification based on their integrative activity. Second, variations of the parameters weight coefficients allow manipulation with behavior parameter influence on the final result. Third, formally there is no limit for adding behavior parameters to the array that describes behavior. Integrative behavior time series, which we obtained after these parameters recalculation with Euclidean method, may be analyzed using different statistical methods. Another advantage of this step is that we can see dynamics of animal's behavior.

From another side the same *Dcor* value is observed in the case when animals have different behavior patterns – animal with active movements and less changes in positions and vice versa.

Finally our method allows overall evaluating of animal behavior. An animal's behavior is visualized using 3-D or time series plots and correlation dimension gives it a numerical value.

## REFERENCES

1. Alasonati, E., Comino, E., Ianoz, M., Korovkin, N., Rachidi, F., Saidi, Y., Zryd, J.P., Zweiacker, P. Fractal dimension: A method for the analysis of the biological effects of electromagnetic field. Proceedings of the 5th International Symposium on Electromagnetic Compatibility and Electromagnetic Ecology, St-Petersburg, Russia. 2003; 405-407
2. Foss, J., Apkarian, V., & Chialvo, D. Dynamics of Pain: Fractal Dimension of Temporal Variability of Spontaneous Pain Differentiates Between Pain States J Neurophysiol. 2006; 95: 730-736.
3. Grassberger, P., & Procaccia I. Characterization of Strange Attractors. Physical Review Letters. 1983; 50(5), 346-349.
4. Mandelbrot, B. B. The Fractal Geometry of Nature, New – York: Freeman, 1982;
5. Nams, V. The VFractal: a new estimator for fractal dimension of animal movement paths. Landscape Ecology, 11.5,M 1996; 289-297

# IMUNOGLOBULĪNU SEMIKVANTITATĪVO TESTU PIELIETOŠANAS NOZĪME GOVJU GANĀMPULKU VESELĪBAS KONTROLĒ

## THE IMPORTANCE OF APPLICATION OF IMMUNOGLOBULIN SEMI-QUANTITATIVE TESTS TO CONTROL THE COW HERD HEALTH

**Māra Viduža<sup>1</sup>, Laima Liepa<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Latvijas Veterinārārstu biedrība, Latvija,  
Latvian Association of Veterinarians, Latvia,

<sup>2</sup>LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija  
LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[lvb@lvb.lv](mailto:lvb@lvb.lv), [Laima.Liepa@llu.lv](mailto:Laima.Liepa@llu.lv)

### ABSTRACT

The aim of the research was to find out the concentration of immunoglobulin (Ig) in subclinical acidosis affected cows and supply of immune substances in the newborn calves after consumption of colostrum. The research was carried out in a loose housing system cow shed with 400 cows, 210 of them were milking cows. Thirty-two milking cows were used for the experiment; they had calved from 24 April to 23 June 2010. The cows are fed on a total mixed ration with low fiber content that causes subclinical acidosis in all cows. Calves are kept in individual cages for 3 months after birth. Due to management peculiarities on the farm, the first feeding time of colostrum is not controllable. Respiratory and gastrointestinal diseases in calves are observed. Monthly mortality rate of calves is 8 to 10%.

The concentration of immunoglobulin in colostrum and in the serum of calves was estimated by using semi-quantitative methods measuring the colostrum density with Kruuse Colostrum Densimeter, Ig in calves' serum was estimated with Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> precipitation reaction, GGT activity in calves' serum was estimated in the Central Laboratory, Ltd.

The average amount of immunoglobulin was  $1054.6 \pm 1.8$  mg/dl, Ig concentration in the serum of calves after colostrum feeding was from 1000 to 1500mg/dl, and the average GGT result was  $1744.4 \pm 437.8$  IU/l.

The Ig concentration in colostrum and GGT parameter in calves are not dependent on the subclinical acidosis background in the herd. The level of Ig in colostrum does not differ significantly by lactations. GGT parameter in calves from the first-calf heifers is lower than in calves obtained from cows of lactations. The use of semi-quantitative tests in control of the herd health improves the breeding management of young animals and decreases mortality rate in calves during the first weeks of life.

**KEY WORDS:** colostrum, calves, GGT, immunoglobulin (Ig).

### IEVADS

Strādājot slaucamo govju novietnē, veterinārārstam bieži jārisina teļu veselības problēmas. Ja saimniecībā dzīvniekus izmanto pēc intensīvas tehnoloģijas metodēm, tad vidējais govs ražības un arī dzīves ilgums reti pārsniedz divas laktācijas. Tāpēc, lai atražotu slaucamās govīs no pašu iegūtajiem teļiem, ir svarīgs katrs dzimušais

jaundzīvnieks un viņa veselība. Tās raksturojošais lielums ir imūnglobulīnu līmenis asinīs.

Lielākas dzīvnieku koncentrācijas apstākļos, ja vienkopus ir vairāk par 100 laktējošām govīm un liels teļu daudzums, novietnē ir sava mikroflora, kas pasažējoties veicina mikrofloras dzīvotspēju, virulences celšanos un izplatīšanās iespējas [5]. Turklāt atsevišķi nosacīti patogēni mikroorganismi iegūst stipri patogēnas īpašības [7]. Jaundzimušo dzīvnieku rezistenci galvenokārt nosaka antivielu daudzums un kvalitāte, kā arī organisma spēja tās sintezēt. Jaundzimušo teļu organisma rezistences veidošanās procesā sevišķi liela nozīme ir jaunpiena olbaltumvielām un it īpaši imūnglobulīniem (Ig) [9,10]. Normālos apstākļos tie nepārveidoti uzsūcas organismā no zarnu trakta pirmo 12-24 stundu laikā pēc piedzimšanas un tieši piedalās antivielu veidošanā [7,8].

Govs jaunpiens satur 1.4 reizes vairāk tauku, 4.5 reizes vairāk olbaltumvielu un 1.7 reizes vairāk minerālvielu nekā parasts piens. Jaunpiena blīvums 1.040...1.080 g/ml. Piena blīvums atkarīgs no tā sastāva. Tas paaugstinās, ja pienā paaugstinās beztauku sausnas daudzums. No jaunpiena olbaltumvielām pirmajā slaukumā ir 71% imūnglobulīnu un 20% beta laktoglobulīna. Paaugstinātā imūnglobulīnu koncentrācija jaunpienā saglabājas līdz 5.- 6. laktācijas dienai [2]. Vidējais blīvums parastam govju pienam 1.030 g/ml [2]. Piena blīvumu nosaka ar laktodensimetru 20°C temperatūrā. Izmeklējumu ar *colostrum* densimetru, kas ir graduēts un speciāli paredzēts tikai jaunpienam, iesaka dāņu uzņēmums Kruuse. Šī metode dod iespēju kontrolēt jaunpiena Ig koncentrāciju semikvantitatīvi [9]. Vācu veterinārārsti izmanto vēl citu semikvantitatīvu testu – refraktometrisko metodi jaunpiena ēdināšanas kvalitātes kontrolei [5]. Līdz šim trūkst pētījumu par Ig līmeni jaunpienā ar subklīnisku acidozi slimu govju ganāmpulkā.

Teļu imunoloģiskā statusa novērtēšanai lauka apstākļos var izmantot vairākus semikvantitatīvos testus: refraktometrisko [5,7] reakciju, precipitācijas reakciju ar cinka sulfātu vai nātrija sulfātu [7,10]. Seruma Ig līmeņa noteikšana pamatojas uz seruma olbaltumvielu nogulsnešanos ar dažādiem sāļiem, tas atkarīgs no sāls koncentrācijas un olbaltumvielu molekulārā rakstura [7,10].

Tā kā pirmajā dzīves dienā jaunpiena imūnvielas bez izmaiņām spēj uzsūkties no zarnu trakta, tad teļa asins paraugā esošais Ig daudzums raksturo jaundzimušā dzīvnieka imunoloģisko statusu [8,9].

Teļiem agrajā postnatālajā periodā (pirmajās 6-48 dzīves stundās), atkarībā no jaunpiena uzņemšanas daudzuma, strauji pieaug gamma-glutamīltransferāzes (GGT) aktivitāte serumā, pat par 100 reizēm pārsniedzot pieaugušas govju fizioloģisko normu. Jaunpiens ir bagāts ar šo fermentu, un to izmanto kā jaunpiena savlaicīgas un pietiekamas izēdināšanas rādītāju. Ja GGT aktivitāte serumā otrajā dzīves dienā ir zemāka par 100 IU/l, dzīvniekam nav pietiekoši izēdināts jaunpiens [4,9]. Normālā GGT koncentrācija asinīs serumā govīm ir 4-30 IU/l [3,4,6,9].

Mūsu pētījuma mērķis: noskaidrot imūnglobulīnu koncentrāciju jaunpienā ar subklīnisku acidozi slimām govīm un imūnvielu nodrošinājumu šo govju teļu serumā pēc jaunpiena uzņemšanas.

## **MATERIĀLS UN METODIKA**

Pētījums veikts 400 govju vaļējā tipa nepiesietā turēšanas veida novietnē, kurā atrodas 210 slaucamās govīs. Ēdināšanas veids: pilnīgi samaisīta barība, kurā ir zems šķiedrvielu saturs un kas visām govīm rada subklīnisku acidozi. Slaukšana notiek slaukšanās zālē, piena uzskaitē un kontrole elektroniska. Slaucamas govīs ataudzē no pašu ganāmpulkā iegūtajiem teļiem.

Teļi pēc piedzimšanas 3 nedēļas tiek turēti individuālajos sprostos. Jaunpiena pirmā izēdināšanas reize saimniecības mēdžementa īpatnību dēļ nav kontrolējama. Teļiem novēro respiratoras un gastroenterālas saslimšanas. Teļu nobeigšanās ir 8-10 % mēnesī.

Eksperimentā izmantotas 32 slaucamas govīs, kuras atnesušās 2010. gadā no 24. aprīļa līdz 23. jūnijam.

Jaunpiens iegūts no govīm pirmajā slaukšanas reizē. Jaunpienā, īsi pirms izdzirdināšanas teļiem, Ig koncentrācija noteikta ar semikvantitatīvu lauka testu, mērot jaunpiena blīvumu 20°C temperatūrā ar *Colostrum* densimetru (“Kruuse”). Densimetra skala ir 1025 līdz 1075 mg/dl robežās. Rezultātu interpretāciju veic atbilstoši ražotāja norādītajai tabulai: rezultāts mazāks par 1035 mg/dl – sliktas kvalitātes; robežās no 1035 līdz 1045 mg/dl – vidēji labas kvalitātes; rādījums no 1045 līdz 1075 mg/dl – labas kvalitātes pirmpiens.

Teļu serums iegūts no 15 dzīvniekiem, asiņu paraugu noņemot vakuuma stobriņā 24 stundas pēc piedzimšanas. Imūnvielas serumā noteiktas ar semikvantitatīvu metodi – imūnglobulīnu (Ig) precipitācijas reakciju ar Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> – 14, 16, 18% šķīdumos. Reakciju nolasa 3 stobriņos, kuros ir pa 9,0 ml 14, 16 un 18% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> šķīduma, kam klāt pievienots pa 100 µl seruma. Precipitācijas reakciju ( gredzena veidošanās un pārslu izkrišana) novēro 1 stundas laikā ( 1.tabula).

1.tabula/Table 1

**Teļa seruma Ig līmeņa noteikšana izmantojot nātrija sulfīta precipitācijas reakciju [7,10]**

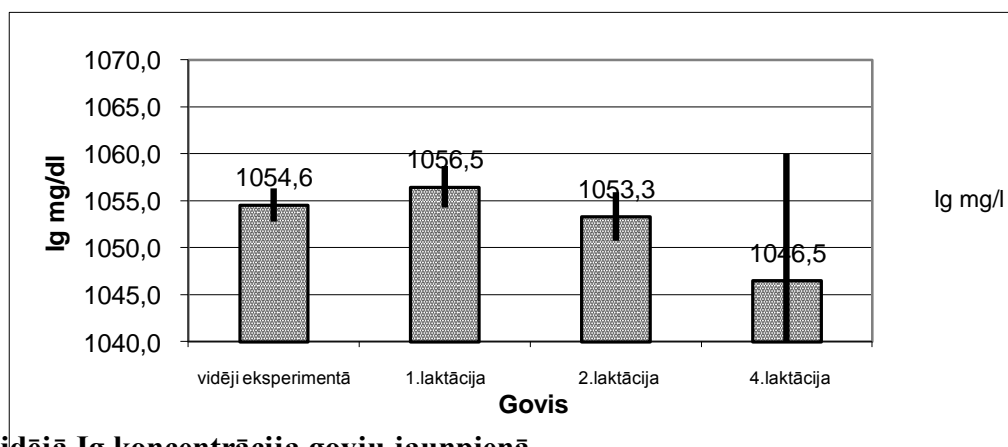
**Interpretation of Ig concentration in calf serum using Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> precipitation reaction [7,10]**

Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> šķīduma koncentrācija Solution of sodium sulfite			Ig( mg/dl) in serum	Līmenis Level
14%	16%	18%		
		+	<500	1
	+	+	500-1000	2
+	+	+	>1500	3

SIA “Centrālā laboratorija” noteikta GGT aktivitāte teļu serumā. Iegūtie dati analizēti, izmantojot MS Excel datu statistiskās apstrādes metodes.

**REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

Eksperimenta govīm jaunpienā vidējais imūnglobulīnu daudzums noteikts 1054.6 ± 1.8 mg/dl (1. attēls), rādītāju amplitūda konstatēta 1025 līdz 1066 mg/dl robežās. Visi mērījumi (izņemot vienu) iekļaujas normas robežās 1040 līdz 1080 mg/dl un atbilst vidējam un augstam Ig līmenim jaunpienā [10]. Konstatējot vienā jaunpiena paraugā 1025 mg/dl Ig, tika veiktas pārrunas ar slaucēju, kurās noskaidrojās, ka jaunpiens pirms izdzirdināšanas teļam ir atšķaidīts. Teļš nobeidzies pirmajā dzīves diennaktī. Tas nozīmē, ka govīm subklīniskas acidozes apstākļi neietekmē jaunpiena Ig koncentrāciju.



1. attēls. Vidējā Ig koncentrācija govju jaunpienā

Figure 1. Mean results of Ig in colostrum of cows

Visi pārbaudītie 32 jaunpiena paraugi tika grupēti pa govju laktācijām: 13 pirmpienes, 16 – otrās laktācijas, 2 – ceturtās laktācijas un 1 – piektās laktācijas govjs. Eksperimenta laikā pārsvarā atnesās pirmpienes un 2. laktācijas govjs. Starp 1. un 2. laktācijas govju jaunpiena vidējiem Ig daudzumiem (2.tabula) nav konstatētas būtiskas atšķirības ( $p > 0,05$ ) (1.attēls). Taču Ig koncentrācijai ir tendence samazināties, pieaugot govju laktāciju skaitam.

Veicot semikvantitatīvo lauka testu ar  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 15 teļu asinīs pēc *colostrum* izdzirdināšanas konstatētā Ig koncentrācija 1000 līdz 1500 mg/dl robežās, kas atbilst vidējam imunoloģiskajam statusam [10] (2. tabula). Tātad, izdzirdinot teļiem ar subklīnisku acidozi slimu govju jaunpienu, viņu serumā tiek nodrošināta vidēji augsta Ig koncentrācija.

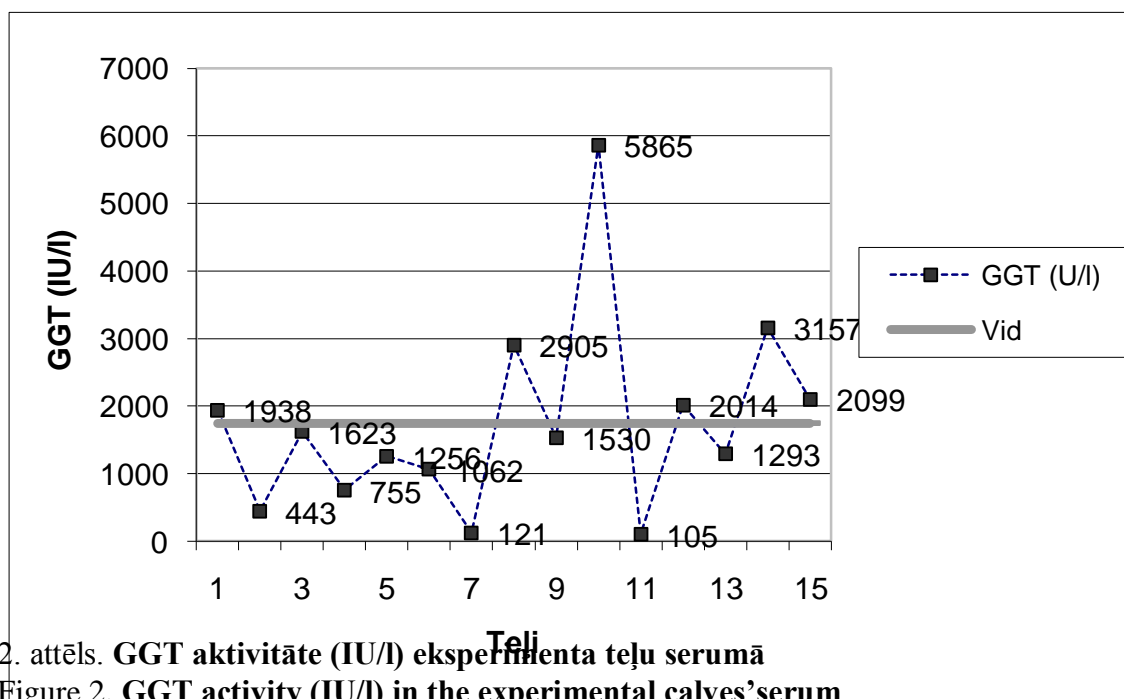
2.tabula/Table 2

**Imunitāti raksturojošie vidējie rezultāti eksperimenta govīm un teļiem**  
The mean results attributable to immunity of the experimental cows and calves

Govis Cows	Skaits Number	Ig in colostrum mg/dl	GGT konc. teļa serumā GGT in serum of calf (IU/l)	Ig līmenis teļa serumā* Ig level in serum of calf
1.laktācija /lactation	8	1056.5 ± 22	1262.9 ± 315.0	2.6 ± 0.2
2.laktācija/lactation	5	1053.3 ± 2.6	2161.4 ± 977.8	2.2 ± 0.4

\*līmenis (level): 1. <500; 2. =500-1000; 3. >1500 mg/dl

Eksperimenta teļu grupai vidējā seruma GGT aktivitāte ir pietiekami augsta  $1744 \pm 437.8$  IU/l, kas pārsniedz fizioloģiskās normas rādītājus vidēji 145 reizes [1, 4, 6, 9, 10]. Tātad govju subklīniskas acidozes apstākļos teļiem GGT aktivitāte pēc savlaicīgas un kvalitatīva jaunpiena izdzirdināšanas atbilst vispārpieņemtajiem fizioloģiskās normas rādītājiem.



2. attēls. GGT aktivitāte (IU/l) eksperimenta teļu serumā  
 Figure 2. GGT activity (IU/l) in the experimental calves' serum

Eksperimentā iegūtie rādītāji ir ļoti plašā amplitūdā: no 105 līdz 5865 IU/l (2. attēls), tomēr lielākais rezultātu skaits ir robežās no 1000 līdz 2100 IU/l. Zemākā GGT aktivitāte 105 IU/l liecina par zemu imunitāti [1, 4, 6, 9, 10] un to konstatēja teļam, kas saņēma atšķaidītu jaunpienu [4]. Arī  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  precipitācijas reakcijā konstatētā seruma Ig koncentrācija šim teļam noteikta zem 500 mg/dl, kas atbilst zēmam imunoloģiskajam statusam [10]. No pirmpienēm iegūtajiem teļiem 24 stundu vecumā seruma GGT vidējā aktivitāte  $1262.9 \pm 315.0$  IU/l ir ievērojami zemāka nekā otrajā laktācijā  $2161.4 \pm 977.8$  IU/l, tomēr atšķirības nav būtiskas ( $p > 0.05$ ) (2. attēlā).

Eksperimenta laikā uzsāktā jaunpiena Ig līmeņa noteikšana uzlabojusi situāciju teļu veselības kontrolē – teļu saslimšana ar caureju un nobeigšanās samazinājusies no 10% līdz 5% mēnesī. Semikvantitatīvo testu veikšana lauka apstākļos ir vienkārša. Tā ir metode, kas ļauj noteikt Ig koncentrāciju jaunpienā un zemas Ig koncentrācijas gadījumā teļa dzirdināšanai izmantot citas govju jaunpienu. Ja pārbaudītajā piena paraugā Ig koncentrācija ir 1045 līdz 1075 mg/dl, tad teļam, pirmajā dzīves stundā saņemot šādu jaunpienu, pēc vienas diennakts seruma Ig koncentrācijai jābūt vismaz 1000 līdz 1500 mg/dl (pēc  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  precipitācijas testa rezultātiem) vai GGT aktivitātei jābūt vidēji  $1744 \pm 437.8$  IU/l. Ja teļu imunitāti raksturojošie rādītāji ir zemāki, tad ir jāmeklē kļūdas viņu dzirdināšanā ar pirmpienu.

## SECINĀJUMI

1. Subklīniskā acidoze neietekmē govju imūnglobulīnu koncentrāciju jaunpienā.
2. Izdzirdinot ar subklīnisku acidozi slimu govju jaunpienu, teļu serumā imūnglobulīnu koncentrācija ir vidēji augstā līmenī un gamma-glutamīltransferāzes aktivitāte vairāk kā 100 reizes pārsniedz pieaugušas govju fizioloģiskās normas rādītājus.
3. Ar katru nākošo laktāciju govju jaunpienā vidējai imūnglobulīnu koncentrācijai ir tendence samazināties ( $p > 0.05$ ).
4. No pirmpienēm iegūtajiem teļiem 24 stundu vecumā seruma GGT vidējā aktivitāte ir nebūtiski ( $p > 0.05$ ) zemāka kā vēlāku laktāciju govju pēcnācējiem.



5. Jaunpiena un teļu seruma semikvantitatīvo testu izmantošana govju ganāmpulka veselības kontrolē uzlabo jaundzīvnieku dzirdināšanas noteikumu izpildi un teļu veselības rādītājus: samazina gastroenterālās saslimšanas un nobeigšanās skaitu.

#### LITERATŪRA

1. Bertoni, G., Ferrari, A., Gubbiotti, A., Trevisi, E. Blood indicēs calves: relationship with mother values and changes in the first days of life. – *Ial.J.Anim.Sci.vol 8 (suppl 2)* 2009; 595-597.
2. Daugerts, R., Garančs, A. Laktācijas fizioloģija. – Rīga: Zvaigzne, 1985; 149.
3. Duncan & Passè's. *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. – Iowa : State Press, 2003; 450.
4. Jemeljanovs, Ļ., Manevičs, Z., Dūrītis, I. Dzīvnieku iekšējo slimību klīniskā diagnostika. – Jelgava: 2007; 242.
5. Kaske, M., Kunz, H.-J. Überprufung des Kolostrum-Managements mittels Refraktometer: Optionen und Implikationen.
6. Liepa, L. Asiņu bioķīmisko rādītāju klīniskā interpretācija govīm. – Jelgava, 2000; 43.
7. Mozgis, V. Vesela govs – zemnieka krājkase. – Rīga: Zinātne, 1994; 201.
8. Neilands, J. Slimību profilakse piena lopkopībā. – Rīga: Avots, 1986; 157.
9. Radostits, O.W. & all. *Veterinary medicine. 10th Edition*. – 2007; 2155.
10. Rebhun, W.C., Guard, Ch., Ricards, C.M. *Diseases of Dairy Cattle*. – Lippincott Williams & Wilkins, 1995; 530.

# TESTING METHODS OF CANINE AND FELINE BLOOD GROUPS COMPATIBILITY IN CLINICAL CONDITIONS

**Jelena Andrejeva, Aija Ilgaža**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Preklīniskais institūts, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

**INTRODUCTION:** To carry out the blood transfusion procedure for animals, first of all the blood compatibility should be done. That is important in order to prevent haemolytic reactions after incompatible blood transfusion and also from the same agglutination reaction in animal during the neonatal period if the mother and the puppy or kitten shares the same type. Beside the most popular testing methods described in literature as "glass slide" and "test tube" methods or Kumba reactions, in the veterinary clinics use as well the direct test (slide test with mixing animal blood drops), and the special blood-grouping express-tests. In publications and study materials it's started that the agglutination reaction after blood transfusion is caused by more than first simple immunological reactions between donor \ recipient antigen and antibody. One to this several key methods that are used to determine the compatibility of blood – which is done before blood transfusion. The aim of our study was to compare the usability of tests of the donor and recipient blood compatibility and to evaluate the accuracy of the obtained results of these tests in the veterinary clinic conditions.

**MATERIAL AND METHODS:** The group of dogs (n=10) and cats (n=10) was formed. Blood samples were collected from randomly included animals (pure bred and no breed animals) from *v. brachiocephalica* or *v. jugularis externa*. We tested the donors and recipients blood compatibility with two basic methods, direct method and *Alvedia Quick* Express-test. Taking into account that the first blood transfusion in dogs usually is quite safe, and to make our research more close to the real conditions, we performed the immunisation in few animals with other blood from the same species animal. The Kumb reaction was very complex and problematic to perform in the clinic. During the research the equipment, performance and conditions were close to real clinic conditions.

**RESULTS:** By comparing all four methods of donor and recipient blood compatibility we found that the faster way to compare the blood compatibility was the express-test (not more than 5 min), and also the mixing a blood drops on the slide. The „glass slide” and the „test tube” methods performance required 60 min, but the Kumba test was not possible to perform at all for many reasons. Precision tests of the donor and recipient blood compatibility were *Alvedia Quick* Test 100 %, direct method 26 %, “glass slide” method 14,3% and “test tube” method 14,3 %.

We can **conclude** that in the veterinary clinic only the Express-test (for example *Alvedia Quick*) method is faster and more accurate than others.

## PRELIMINARY DATA ON TICK-BORNE DISEASES IN DOGS IN LATVIA

**Inese Berzina, Ilze Matisē**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

**INTRODUCTION:** There have been isolated case reports of tick-borne diseases (TBD) in dogs in Latvia, however no studies have been conducted to determine prevalence of these diseases in dogs in Latvia.

**MATERIALS AND METHODS:** Clinically healthy dogs (group 1) and dogs with clinical signs suggestive of TBD (group 2) were enrolled in the study. Blood was drawn from all dogs and analyzed hematologically (analyzer and microscopy) and with IDEXX SNAP 4Dx test which detects antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis*. Information regarding tick exposure and ectoparasite control habits was collected from the owners of the dogs enrolled in the study.

**RESULTS:** In group 1 (n=60), mean age of the dogs was 4.3 years (range 2 months -13 years); sex: 28 female, 32 male; various breeds were represented. In group 2 (n=15), mean age of the dogs was 6.3 years old (range 1.5-10 years), sex: 7 female, 7 male, 1 unknown, various breeds were represented. Among clinically healthy dogs one was positive for *A.phagocytophilum*. Three dogs with clinical signs were positive for *A.phagocytophilum* and one for *E.canis*. The prevalence of anaplasmosis was calculated at 1.6 % in healthy dogs and 20% in dogs with TBD clinical signs.

**CONCLUSIONS:** Preliminary data show that TBD in dogs in Latvia are encountered with similar frequency as in Poland and Sweden.

# A RAPID EFFECT OF HANDLING ON COUNTS OF WHITE BLOOD CELLS IN A WINTERING PASSERINE BIRD: A MORE PRACTICAL MEASURE OF STRESS?

**Dina Cirule<sup>1,2</sup>, Tatjana Krama<sup>2</sup>, Jolanta Vrublevska<sup>2</sup>, Indrikis Krams<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, Riga, Latvia*

<sup>2</sup> *Institute of Systematic Biology, University of Daugavpils, Daugavpils, Latvia*

[dina.cirule@bior.gov.lv](mailto:dina.cirule@bior.gov.lv)

## **ABSTRACT**

Measuring circulating glucocorticoids is a widely used method to assess stress in animals. However, hormones must be sampled within the first few minutes of capture, which makes it difficult to discriminate between hormone baseline levels and the levels caused by environmental stress. The use of white blood cell counts made from blood smears represents an alternate method for measuring physiological stress. Since the increase in glucocorticoid hormones causes characteristic long-lasting changes in the leukocyte numbers, we tested whether stress related handling of male great tits (*Parus major*) may cause rapid changes in their leukocyte profile. We found that handling stress significantly increased heterophil counts already between 30 and 60 min after capture, while lymphocyte and eosinophil counts significantly declined between 60 and 120 min after capture. The increase in heterophil counts and reduction in lymphocyte counts caused an increase of heterophil and lymphocyte ratio (H/L) between 60 and 120 min after capture. Overall these results indicate that leukocyte profiles in wintering male great tits may change more rapidly than previously thought, reflecting the condition of acute stress of individual birds.

# MICROBIOLOGICAL SECURITY OF APPLES STORED AT MODIFIED ATMOSPHERE

**Karīna Juhnevica<sup>1</sup>, Gita Skudra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Latvia State Institute of Fruit-Growing,

<sup>2</sup>Latvia University of Agriculture

[karina.juhnevica@lvai.lv](mailto:karina.juhnevica@lvai.lv)

**INTRODUCTION:** It is substantial to maintain the quality of fruits during storage, including their microbiological security. Fruit microbiological security depends on several factors: cleanness of premises, extent of air pollution of storage chambers which could be one of the reasons of pollution and the following quality decrease. Many microorganism species are aerobic and their growth is inhibited in controlled atmosphere with low oxygen concentration. Therefore it is possible to reduce the development of some microorganism species.

**MATERIALS AND METHODS:** The investigation was carried out to find relationships among gas compositions and development of microorganism species during storage. Air quality of storage chambers and microbiological cleanness of apple cultivars 'Gita', 'Saltanat', 'Auksis', 'Korichnoe Novoe', 'Orlik' fruit surface were studied. As a result different microscopic fungi genus as *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* were identified on the apple surface before storage not depending on cultivar. *Penicillium italicum* was the dominant species and from genus *Cladosporium* - *Cladosporium macrocarpum*; from bacteria species - *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* and from yeasts - *Candida curvata*, *Candida fomata*, *Pichia etchellsii*, *Pichia carsonii*.

**RESULTS:** Microorganisms as *Penicillium italicum*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida curvata*, *Pichia etchellsii*, *Candida fomata* were found after apple storage in the controlled modified atmosphere chamber ULO1 (Ultra Low Oxygen) with the content of: O<sub>2</sub> 1%, CO<sub>2</sub> 2% and N<sub>2</sub> 97%. However, only *Penicillium spp*, *Bacillus spp*, *Candida curvata*, *Candida fomata* developed in the chamber ULO2 with O<sub>2</sub> 1.5%, CO<sub>2</sub> 2.5% and N<sub>2</sub> 96%, while several microorganisms: *Botrytis*, *Penicillium*, *Penicillium italicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Candida curvata*, *Candida fomata*, *Pichia etchellsii*, *Pichia carsonii* developed in the common cooling chamber with O<sub>2</sub> 20.96%, CO<sub>2</sub> 0.03% and N<sub>2</sub> 78.06%.

**CONCLUSIONS:** The investigation proved that fewer microorganisms were found in the chamber ULO2, testifying that this content of gases inhibits the growth of microorganisms. Apples stored with this composition of modified atmosphere can be used for food safely, even if they are not washed well. More microorganisms developed on apples stored in the common cooling chamber. It is important to record that bacteria *Bacillus cereus* which developed after storage exudes toxins and cause bacterial toxicopathy in humans.

## OPPORTUNISTIC PARASITE: *TOXOPLASMA GONDII*

### **Gunita Deksne**

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts „BIOR”

Institute of Food Safety, Animal Health and Environment „BIOR”

[gunita.deksne@bior.gov.lv](mailto:gunita.deksne@bior.gov.lv)

**INTRODUCTION:** Toxoplasmosis is a common and cosmopolitan infection in animals and humans. It is caused by an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. Antibodies against *T. gondii* have been detected at different species of animals – insectivorous, bats, birds, rodents, predators etc. The parasite, however, only matures in cats and felids which are the definitive hosts.

Case-control studies conducted in several European countries have shown that primary infection is strongly associated with eating raw or undercooked meat and more weakly associated with soil or with vegetables contaminated with soil. Direct contact with cats has not been identified as a risk factor.

In humans, the majority of infections is asymptomatic or cause mild flu-like symptoms. However, toxoplasmosis can be life threatening especially for immunocompromised individuals. If acquired during pregnancy, toxoplasmosis can cause abortion or congenital malformation affecting the brain, eyes or other organs of the foetus.

In animals, *T. gondii* is an important cause of abortion in sheep and goats. Among meat-producing animals, sheep and pigs are the most frequent carriers. Also the parasite is frequently reported in cats, dogs, wild carnivores, wild boars etc.

The association of *T. gondii* with food-borne and waterborne transmission has resulted in its classification as a B priority agent. Also, toxoplasmosis is on zoonoses that should be monitored according to the epidemiological situation (Directive 2003/99/EC). Considering that there are only fragmentary studies according to *T. gondii* distribution in human and animals which doesn't display real epidemiological situation. Correspondingly there is no regular monitoring in Latvia.

## DYNAMICS OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* COUNTS IN RAW POULTRY MEET DEPENDING ON PACKAGING ATMOSPHERE.

**Kaspars Kovalenko<sup>1</sup>, Aija Ruzaiķe<sup>2</sup>, Mati Roasto<sup>3</sup>, Edgars Liepiņš<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>2</sup>LLU, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of food technology, Latvia

<sup>3</sup>EMÜ, Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, Eesti

EULS, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonia

[kkovalenko@inbox.lv](mailto:kkovalenko@inbox.lv)

**INTRODUCTION:** *Campylobacter* spp. is the most common food borne enteritis cause in European Union. *Campylobacter* are mainly transmitted to human by consuming raw or undercooked poultry meat. *Campylobacter jejuni* is the main cause of human campylobacteriosis and is often found in raw poultry meat. Previous research shows that different atmospheric conditions contribute to different levels of *Campylobacter jejuni* isolated from raw chicken carcasses.

**MATERIALS AND METHODS:** Fresh chicken leg samples (n=26) were artificially contaminated with *Campylobacter jejuni* in log 3 level (ml) of physiological saline solution. Two samples were examined with ISO 10272-2: 2006 for initial colony count per gram of product. After artificial contamination chicken meat samples were packed into modified atmosphere (MAP – CO<sub>2</sub> = 43,8%, O<sub>2</sub> = 0,2%, N<sub>2</sub>=57%), into vacuum and into air atmosphere separate packages. The number of samples for each different packaging was eight (n=8). All samples were stored in refrigerator temperatures from +2°C till +4°C. For each sample after every 48 hours of storage the *Campylobacter* colony counts were registered in accordance of ISO 10272-2: 2006 and ISO 10272-1:2006 methods. The duration of storage experiment was 192 hours (eight days).

**RESULTS:** The data obtained from present research showed that the most rapid decrease in *Campylobacter* counts was during the first 48 hours of storage in air packed samples from initial 23,1\*10<sup>4</sup> CFU/g till 2,6\*10<sup>4</sup> CFU/g, in vacuum till 9,2\*10<sup>4</sup> CFU/g and in MAP till 16,8\*10<sup>4</sup> CFU/g. In eighth day *Campylobacter* numbers in air atmosphere decreased till 0,7\*10<sup>4</sup> CFU/g in vacuum till 5\*10<sup>4</sup> CFU/g, in MAP till 6,5\*10<sup>4</sup> CFU/g.

**CONCLUSIONS:** The best packaging atmosphere for fresh chicken meat is air atmosphere packaging and the most inappropriate is MAP packaging. There is need for additional studies to determine the best atmosphere modifications for reducing *Campylobacter* in raw chicken meat.

## EVALUATION OF THE TEAR PRODUCTION IN DOG FOLLOWING GENERAL ANESTHESIA

**Līga Kovalčuka, Artis Bečs, Līga Strode**

LLU, VMF Preklīniskais institūts, Latvija

LUA, VMF Preclinical institute, Latvia

**INTRODUCTION:** The objective of this study was to evaluate the effect of premedication and general anesthesia on tear production in clinically normal dogs.

**MATERIAL AND METHODS:** Twenty dogs of various ages, breeds and genders were examined clinically and ophthalmologically. The dogs have no history or clinical signs of ophthalmic disease. All dogs received atropine sulfate (0.04 mg/kg) and acepromazine maleate (0.1 mg/kg) intramuscularly as a premedication. Ten minutes after premedication intravenous injection of ketamine hydrochloride (5.5 mg/kg) and diazepam (0.25 mg/kg) was added as a general anesthesia. During the surgery isoflurane was used as an inhalation anesthesia. Schirmer tear test 1 (STT 1) was measured bilaterally before and after premedication, one minute after intravenous anesthesia, during anesthesia and five minutes after the surgery.

**RESULTS:** There was a significant decrease in tear production ten minutes after the premedication from the mean base-line value of  $16.6 \pm 2.6$  mm/min to  $13.9 \pm 2.2$  mm/min. One minute after intravenous anesthesia tear production continued to decrease for an average  $2.6 \pm 2.8$  mm/min. During the anesthesia STT 1 decreased for a more  $4.3 \pm 5.6$  mm/min ( $P < 0.05$ ), gaining  $7.0 \pm 3.8$  mm/min. Five minutes after surgery the mean tear production was only  $2.8 \pm 2.5$  mm/min. Decrease of the tear production from the base-line value till the last measurement (after the surgery) was  $13.8 \pm 3.3$  mm/min ( $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** These observations indicate that premedication (atropine sulfate and acepromazine maleate), general anesthesia (ketamine hydrochloride and diazepam) reduces tear production in clinically normal dogs. Sterile ocular lubricant or tear replacement should be used as a corneal protectant during the general anesthesia.



# CHANGES OF PHYSIOLOGICAL INDICES AFTER RENEWAL OF BALANCED FEEDING OF STARVATING COWS IN THE MAXIMUM PERIOD OF LACTATION

**Laima Liepa, Ilmārs Dūrītis, Daiga Rudevica**

LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia.

[Laima.Liepa@llu.lv](mailto:Laima.Liepa@llu.lv)

**INTRODUCTION:** The aim of our study was to investigate changes of biochemical indices of milk and serum of dairy cows in the middle period of lactation in association with extreme nutritional changes: in the second month (I) of lactation- at the 6 week underfeeding (UF) only with low quality alfa-alfa silage; and in the fourth month (II) – 30 days after renewal of sufficient and balanced feeding (RF).

**MATERIALS AND METHODS:** The experiment was carried out in one 200-cows herd with unified nutrition. The UF did not allow animals to reach the maximum milk yield. In I two groups were selected: 10 high productive (25.4 to 32.3 kg/day) and 10 low productive (11.2-18.8 kg/day) cows. Milk and blood samples were collected 2 times (in I and II) at the monthly milk quality control. Biochemical indices were statistically analyzed by SPSS 11.5.

**RESULTS:** In I cows reacted with lower body condition, coprophagia, reduction of milk protein (MP) and urea (MU), serum albumin (Alb) and urea (SU) concentration below physiological reference level (RL). There were higher serum triglyceride concentration and AST activity, but total bilirubin (TB) and glucosis concentration were in low RL. The direct bilirubin concentration (53% of TB) and high serum protein (TP) level is associated with dehydration and hyponatremia.

In II cows had significant ( $p < 0.001$ ) reduction in milk production, but MP was higher and milk fat % was lower ( $p > 0.05$ ) than in I. TP and Alb are significantly ( $p < 0.001$ ) lower after renewed salt feeding. There were detected reduction of lipolysis and cholestasis and better liver functions ( $p > 0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** UF of cows in I reacted with lipolysis and subclinical extensive hepatocellular damage, without reduction of liver functions. There is high correlation ( $r = 0.83$ ) between MU and SU concentrations and both are objective indices for detection of deficiency of rumen digestible protein in UF and RF conditions. TP is not an objective parameter for control of feeding quality at nutritional salt deficiency. In II there is a significant reduction of milk production (more for high productive cows) and increase in MP, MU and SU concentrations ( $p < 0.01$ ). One month of RF is insufficient period for Alb to achieve RL. The more productive cows has higher serum cholesterol concentration in both UF and RF conditions.

# SEASONAL OUTBREAKS OF TYZZER'S DISEASE IN MALAGASY GIANT JUMPING RATS (*HYPOGEOMYS ANTIMENA*) IN THE RIGA ZOO

**Ilze Matise<sup>1</sup>, Tatjana Ivasko<sup>2</sup>, Guna Vitola<sup>2</sup>, Arno Wunschmann<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>2</sup>Riga Zoo

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, University of Minnesota

**INTRODUCTION:** Two outbreaks of sudden mortality in Malagasy giant jumping rats have occurred in Riga's Zoo. During the first outbreak in fall of 2004 7/8 rats died. In the second outbreak (fall of 2009) 2/2 rats died. Animals of all ages were affected.

**MATERIALS AND METHODS:** Necropsies, histopathology, special staining, and PCR were used to determine the cause of outbreaks.

**RESULTS:** Acute hepatic necrosis was detected in 3/4 rats examined from 2004 outbreak and in both rats from 2009 outbreak. Large, slender bacilli, typical of *Clostridium piliforme* were seen in Warthin-Starry silver stained sections. In 2009 cases *C. piliforme* DNA was found in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissues by PCR. Sequencing of conserved region of *C. piliforme* showed that the strain was 99% homologous to mouse isolate. These findings support Tyzzer's disease as the cause for both outbreaks.

**CONCLUSIONS:** Occurrence of both Tyzzer's disease outbreaks in the fall indicates that wild rodents which start to move indoors during cooler nights may be carriers of *C. piliforme*. While the susceptibility of Malagasy giant jumping rats to *C. piliforme* is not known, these two outbreaks suggest that this rodent species may have increased sensitivity to Tyzzer's disease.

# RABIES ORAL VACCINATION IN LATVIA – PAST, PRESENT AND FUTURE

**Edvīns Olševskis<sup>1</sup>, Edgars Liepiņš<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Pārtikas un veterinārais dienests, Latvija

Food and Veterinary Service, Latvia

<sup>2</sup> LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

[Edvins.Olsevskis@pvd.gov.lv](mailto:Edvins.Olsevskis@pvd.gov.lv)

**INTRODUCTION:** Rabies is an enzootic disease in Latvia for more than 40 years. The main reservoirs of rabies virus are red fox (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procinoides*). There were 5881 rabies cases in a various animal species and three human cases registered from 1991 to 2009.

**MATERIALS AND METHODS:** Rabies eradication using oral vaccination of wild animals has been started in 1991 by State Veterinary Service (Food and Veterinary Service since 2001). More than 12.6 million vaccine baits were distributed in a territory of Latvia from 1991 to 2009. In order to evaluate efficiency of rabies oral vaccination (ROV) since 1991 three separate periods were established:

Period 1 – oral vaccine (without biomarker tetracycline) were distributed manually by hunters in small quantity irregularly in some regions (1991-1997). During this period 27 943 vaccine baits were distributed (0.22% from total amount of 12.6 million);

Period 2 – oral vaccine (containing biomarker tetracycline) were distributed manually by hunters in a limited amount and territory (1998-2004). During this period 1 106 100 vaccine baits were distributed (8.73% from total amount of 12.6 million);

Period 3 - aerial distribution of oral vaccine (containing biomarker tetracycline) covering all territory of Latvia (2005-2009). During this period 11 538 500 vaccine baits were distributed (91.05% from total amount of 12.6 million).

Analysis of changes in rabies incidence in different periods was carried out.

**RESULTS:** Results of the analysis showed that ROV implemented incompletely with limited resources were ineffective during Periods 1-2, moreover rabies incidence reached peak in 2003 (963 cases). After the change of ROV strategy in 2005 (Period 3) rabies incidence were decreased to 69 cases in 2009.

**CONCLUSIONS:** There is need to continue ROV of rabies virus reservoirs in order to eradicate rabies in Latvia and move forward to officially rabies free country status. Detailed analysis of Period 3 is necessary for further possible improvements of rabies eradication programme in a future. Close collaboration with neighbouring countries is essential to ensure successful rabies eradication in Baltic countries. One of the further steps to protect Latvia from introduction of new rabies cases from Russia and Belarus is development of buffer zone where ROV is carried out on a regular basis.

# LYMPH NODES' HISTOLOGICAL STATUS OF PIGS WITH PORCINE CIRCOVIRUS-2

**Inga Piginka<sup>1</sup>, Edite Birgele<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR"

<sup>2</sup> LUA, Faculty of Veterinary Medicine

**INTRODUCTION:** The effect of porcine circovirus-2 (PCV2) on the pig immune system are not yet fully know, but it has been reported that the main target cells for PCV2 replication are the monocyte/macrophage lineage cells. Aim of study is to investigate lymph nodes' histological sight of naturally infected pigs with PCV2. Study includes previous results about this investigation.

**MATERIALS AND METHODS:** Investigation included three death pigs from one herd. The main clinical signs for animal selection criteria were lose of weight, respiratory diseases and diarrhea. Blood serum and lymph nodes samples (*lnn. inguinales superficiales sinister at dexter, traheobronchales* and *jejunales*) have been collected from each pig. Samples from pigs have been taken no longer those 12 hours after animal death.

Blood samples were serologically tested for circovirus-2 antibody by enzyme-linked immunosorbent assay (Synbiotics, Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking kit). The lymph nodes' tissues were fixed in 10% formalin approximately 24 hours, processed embedded in paraffin, sectioned at 4 µm thickness, stained with Haematoxylin&Eosin. Lymph nodes have been investigated for PCV2 by immunohistochemistry with PCV2 monoclonal antibody (Ingenasa 36A9). Lymphoid tissues were evaluated of lymphoid depletion ranging, replacement of follicles ranging (Opriessnig et al., 2004) and PCV2 antigen presences from 0 (normal) to 3 (severe).

**RESULTS:** All pigs were seropositive to the PCV2. All lymph nodes of one pig showed similar sight: follicles not visible, hard lymphoid depletion, multinuclear gigantic cells near the sinuses and PCV2 antigen presences near the sinuses with evaluation score 1.

Second pig's lymph nodes had different histological sight. Follicles of *lnn. inguinales superficiales* did not visible, follicles of *lnn. traheobronchales* and *lnn. jejunales* did poor visible. Multinuclear gigantic cells have been presence only in *lnn. inguinales superficiales* and *lnn. jejunales*. Large histiocytic cells proliferation was found in *lnn. traheobronchales*. However evaluation of PCV2 antigen is score 3 and similar for all lymph nodes.

Third pig's evaluation for PCV2 antigen and histological sight is different between lymph nodes. Follicles of *lnn. inguinales superficiales* did not visible (score 3), follicles of *lnn. traheobronchales* and *lnn. jejunales* did visible. Multinuclear gigantic cells have not been presence in third pig's lymph nodes.

**CONCLUSION:** Pigs' lymph nodes have different histological sight between animals and lymph nodes and have specific changes (lymphoid depletion, multinuclear gigantic cells etc.), which have been reported in other authors study. On the histological status could to impact the amount of PCV2 and its distribution in lymph nodes. This investigation is in process.

VETERINĀRMEDICĪNAS RAKSTI 2010

LLU Veterinārmedicīnas fakultāte  
K. Helmaņa iela 8, Jelgavā. LV-3004  
Tālrunis 63024662

---

Iespiests SIA tipogrāfija "Universums A"  
Pils ielā 11a, Tukumā, LV -3100  
Tālrunis 63181084