

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

Veterinārmedicīnas fakultāte

Pārtikas un vides higiēnas institūts



Daiga Gāliņa ^{id}

promocijas darbs

**REZISTENTĀ *ESCHERICHIA COLI* IZPLATĪBA CŪKĀM UN TĀ
SAMAZINĀŠANAS IESPĒJAS**

**PREVALENCE AND REDUCTION POSSIBILITIES OF RESISTANT
ESCHERICHIA COLI IN PIGS**

Zinātniskā doktora grāda (*Ph.D*) iegūšanai
Veterinārmedicīnas zinātnē

Promocijas darba zinātniskā vadītāja
Profesore, *Dr.med.vet.* **Anda Valdovska**
Latvijas Zinātņu akadēmijas korespondētājlocekle

Promocijas darba autore

Jelgava
2023

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūtā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā laika periodā no 2014. līdz 2022. gadam.

Promocijas darba izstrādei paraugi iegūti septiņās cūku audzēšanas saimniecībās trīs Latvijas reģionos – Vidzemes, Pierīgas un Zemgales, savukārt sivēnu ēdināšanas pētījums veikts vienā cūku audzēšanas saimniecībā Pierīgas reģionā. Asins hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji noteikti LLU, Veterinārās klīnikas laboratorijā. Audu histoloģiskie preparāti sagatavoti LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā, bet audu imūnhistoķīmiskie preparāti sagatavoti Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centrā. Augu ēteriskās eļļas ieguvām Latvijas Valsts Mežzinātnes institūta “Silava” Meža izejvielu pārstrādes laboratorijā, savukārt augu ēterisko eļļu ķīmiskais sastāvs noteikts LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Agronomisko analīžu nodaļā. Taukskābju saturs cūku muskulatūrā noteikts Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta “BIOR” Ķīmijas laboratorijā. Histoloģisko preparātu histopatoloģiskā izvērtēšana veikta zinātniskā institūta “BIOR” Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā. Paraugu bakterioloģisko, molekulārbioloģisko izmeklēšanu, kā arī histoloģisko un imūnhistoķīmisko paraugu izvērtēšanu veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

Dr.med.vet. Anda Valdovska – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesore, Latvijas Zinātņu akadēmijas korespondētājlocekle.

Oficiālie recenzenti:

Dr.med. Juta Kroiča – Rīgas Stradiņa Universitātes (RSU) Medicīnas fakultātes profesore, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras vadītāja;

Dr.med.vet. Ilmārs Dūrītis – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesors;

Dr.med.vet. Vita Antāne – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesore (*emeritus*).

Promocijas darbs izstrādāts ar sekojošu projektu atbalstu:

- valsts pētījumu programma AGROBIORES „Lauksaimniecības resursi ilgtspējīgai kvalitatīvas un veselīgas pārtikas ražošanai Latvijā”. Projekts Nr. 3 „Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai un dabīgas izcelsmes barības sastāvdaļu izstrāde un pārbaude (Lopkopība) (2014-2018).

AgroBioRes

- projekts Nr. 8.2.2.0/20/I/001 "LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli" (ES32).

ANOTĀCIJA

Daigas Gāliņas promocijas darbs “Rezistentā *Escherichia coli* izplatība cūkām, tā samazināšanas iespējas” izstrādāts laika periodā no 2014. līdz 2022. gadam Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūtā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās Bioloģijas un Mikrobioloģijas nodaļā. Pētījums izstrādāts trīs aktivitātēs – viena no tām bija veltīta rezistentā *E. coli* izplatības noskaidrošanai cūkām Latvijā, bet pārējās divas – rezistences samazināšanas iespējām.

Pirmajā aktivitātē tika ievākti 615 cūku fekāliju paraugi no septiņām Latvijas Republikas cūku audzēšanas saimniecībām. Sekojoši veikta paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana, izolēti 615 komensiālie *Escherichia coli* un noteikta to rezistence pret antibiotikām. Visi iegūtie cūku fekāliju paraugi tika testēti uz paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* klātbūtni. Aizdomīgie ESBL producējošie *E. coli* tika fenotipiski un genotipiski apstiprināti un noteikta to rezistence pret antibiotikām.

Otrajā aktivitātē vienā no cūku audzēšanas saimniecībām (Nr. L3) pēc nejaušības principa atlasījām 4 metienus, kuros ir sivēnmātes ar Landreses un Djurokas krustojuma 14 dienu veciem sivēniem (n=44). Katra metiena sivēni tika iedalīti savā pētījuma grupā – t.i., kontroles grupa (C), probiotiku grupa (P), probiotiku un griķu kliju grupa (PB) un ārstniecības augu grupa (H). Sivēnu ēdināšanas pētījuma laikā, kontroles grupas sivēni saņēma pamata diētu, P un PB grupu sivēni saņēma probiotikas saturošu papildbarību (turpmāk tekstā – probiotikas), kas tika pievienotas pie dzeramā ūdens, bet griķu klijas un atļautu augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu (turpmāk tekstā – augu piedeva) pulveris tika pievienots pie pamatbarības attiecīgi PB un H grupām. Sivēnu ēdināšanas pētījuma perioda ilgums bija sešas nedēļas. Šajā aktivitātē tika izvērtēts probiotiku un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu potenciāls kā antimikrobiālo līdzekļu alternatīvam risinājumam, izvērtējot to ietekmi uz sivēnu vispārējo veselības stāvokli, zarnu veselību un rezistentā *E. coli* izplatību.

Trešajā aktivitātē tika salīdzināta komerciālo un Latvijas (šī promocijas darba autores iegūtas no ārstniecības augiem hidrodestilācijas procesā) ēterisko eļļu antibakteriālā aktivitāte *in vitro* pret fenotipiski un genotipiski apstiprinātajiem ESBL producējošiem *E. coli* izolātiem, kuri bija iegūti no cūku fekālijām Pirmās aktivitātes laikā.

Promocijas darbā izvirzītā hipotēze: baktērijas *Escherichia coli* rezistence pret antibiotikām ir augsti izplatīta cūkkopības saimniecībās Latvijā un probiotiku, kā arī augu izcelsmes produktu lietošana varētu ierobežot *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* izplatību.

Promocijas darba mērķis: izpētīt rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkām Latvijā, izvērtēt tās samazināšanas iespējas, izmantojot dabiskas izcelsmes barības komponentus un līdzekļus.

Mērķa sasniegšanai izvirzītie **promocijas darba uzdevumi:**

1. noskaidrot pret antibiotikām rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkkopības saimniecībās Latvijā. Noteikt paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* sastopamību cūkām;
2. izvērtēt probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz sivēnu un to zarnu veselību – rezistentā *E. coli* izplatību, zarnu mikrobiotu, histomorfoloģisko un imunoloģisko stāvokli, gaļas kvalitāti;
3. salīdzināt Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālo darbību *in vitro* pret cūku fekālajiem paplašināta spektra bēta-laktamāzi (ESBL) producējošiem *E. coli*, kā arī izvērtēt ar kaprīlskābi un nātrija hlorīdu bagātināto ēterisko eļļu izmantošanu šo rezistentu *E. coli* kontrolē.

Personīgais ieguldījums:

1. fekāliju paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana (komensiālās indikatorbaktērijas *E. coli* izolēšana un bioķīmiskā apstiprināšana; paraugu testēšana uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, to fenotipiskā apstiprināšana; *E. coli* un ESBL producējošiem *E. coli* antimikrobiālās jutības (antibiotiku rezistences) noteikšana attiecīgi pret 12 un 18 antibiotikām, izolēto kultūru sagatavošana ilgstošai uzglabāšanai);
2. ārstniecības augu ievākšana, to saturošas augu piedevas sagatavošana sivēnu ēdināšanas pētījuma realizēšanai;
3. iegūto sivēnu fekāliju un zarnu satura bakterioloģiskā izmeklēšana (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaita noteikšana, *E. coli* izolēšana un tā antimikrobiālās jutības (antibiotiku rezistences) noteikšana;
4. savvaļas un Latvijā audzēto ārstniecības augu (*T. vulgaris*, *T. serpyllum* un *S. montana*) ievākšana, ēterisko eļļu ekstrahēšana, izmantojot hidrodestilācijas metodi;
5. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu, kā arī komerciālo bagātināto (ar kaprīlskābi un NaCl) ēterisko eļļu antibakteriālās darbības pārbaude *in vitro*.

Rezistentā *E. coli* izplatības noskaidrošanai, tostarp paplašināta spektra bēta-laktamāzes producējošā *E. coli* klātbūtnes noteikšanai, ieguvām dažāda vecuma cūku (4, 6, 8, 12 nedēļu vecu) un sivēnmāšu fekāliju paraugus no 7 cūku audzēšanas saimniecībām trīs Latvijas reģionos – Vidzemes, Pierīgas un Zemgales, no kurām četras tika uzskatītas kā relatīvi lielas (sivēnmāšu skaits 700-2100) un trīs – mazas (sivēnmāšu skaits 15-40). Bakterioloģiski mēs izolējām komensiālo indikatorbaktēriju *E. coli* un noteicām tā jutību pret 12 antibiotikām. Katru iegūto paraugu testējām uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, veicām aizdomīgo koloniju izolēšanu, fenotipisko un genotipisko apstiprināšanu, nosakot paplašinātā bēta-laktamāzes gēnu *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} klātbūtni. Apstiprinātajiem ESBL producējošajiem *E. coli* noteicām to jutību pret 18 antibiotikām. Izvērtējām ESBL producējošā *E. coli* izplatības atšķirības starp lielajām un mazajām saimniecībām, starp dažāda vecuma cūkām, tika raksturoti biežāk novērotie rezistences fenotipi un ESBL kodējošie gēni.

Lai novērtētu probiotiku un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz zarnu mikrobiotu, tostarp rezistentā *E. coli* izplatību, cūku un to zarnu veselību, kā arī gaļas kvalitāti – atlasījām četrus metienus ar 14 dienu veciem Landrases un Djurokas šķirnes krustojuma sivēniem (n=44) novietnē L3. Katra metiena sivēnus iedalījām kādā no 4 pētnieciskajām grupām – t.i., kontroles grupa (C grupa), probiotiku grupa (P grupa), probiotiku un griķu kliju grupa (PB grupa) un augu grupa (H grupa). Pētījuma laikā, P un PB grupai pie dzeramā ūdens pievienojām probiotikas noteiktā koncentrācijā atkarībā no sivēnu vecuma (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34% un 0.32% atbilstoši 14., 28., 35., 42., 49. sivēnu dzīves dienai). Papildus PB grupas sivēni saņēma griķu klijas – 3% apjomā no barības pamatmasas. H grupas sivēni saņēma atļautu augu (lielās ceļtekas (*Plantago major* L.), lielās nātres (*Urtica dioica* L.) un divšķautņu asinszāles (*Hypericum perforatum* L.) attiecībā 1:1:1) piedevu 1.5% apjomā no pamatbarības masas. Ēdināšanas pētījuma periods bija 6 nedēļas, t.i., no 14. līdz 56. sivēnu dzīves dienai. Mēs izvērtējām barības komponentu ietekmi uz asins hematoloģiskajiem un seruma bioķīmiskajiem rādītājiem, fekāliju un zarnu mikrobiotu (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu), rezistentā *E. coli* izplatību, zarnu histomorfoloģiskajiem mērījumiem, kausveida šūnu, tostarp neitrālo un skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu un blīvumu; epitēlija šūnu proliferāciju un limfocītu infiltrāciju (zarnu imūnhistoķīmiskā analīze); kā arī ietekmi uz taukskābju saturu muskuļaudos.

Lai izvērtētu komerciālo un Latvijas lūpziežu (*Lamiaceae*) dzimtas augu izcelsmes līdzekļu (ēterisko eļļu) potenciālo izmantošanu ESBL producējošā *E. coli* izplatības ierobežošanai cūkkopības saimniecībās, veicām komerciālo un hidrodestilācijas procesā iegūto savvaļas un Latvijā audzēto ārstniecības augu (mazā mārsla (*Thymus serpyllum* L.), parastā timiāna (*Thymus vulgaris* L.) un kalnu pupumētras (*Satureja montana* L.)) ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaudi *in vitro*. Tika noteikts ēterisko eļļu ķīmiskais sastāvs, analizēti to antibakteriālo darbību ietekmējošie faktori, kā arī salīdzināta tīru un bagātinātu (ar

kaprīlskābi un NaCl) komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālā efektivitāte pret fekālajiem ESBL producējošajiem *E. coli*.

Cūku populācijā izolētajiem *E. coli* tika novērota augsta rezistence pret tetraciklīnu, ampicilīnu, trimetoprimu, sulfamethoksazola-trimethoprimu, amoksicilīnu-klavulānskābi un tie raksturojās ar ļoti daudzveidīgiem rezistences fenotipiem; būtiski augstāka antibiotiku rezistentā *E. coli* izplatība bija novērojama lielajās saimniecībās. Rezistentā *E. coli* pārvešana cūkām samazinās līdz ar ražošanas cikla noslēgumu, proti, būtiski mazāk rezistentu *E. coli* izolē no nobarojamajām cūkām. Fekālo ESBL producējošo *E. coli* klātbūtne tika konstatēta trīs lielajās (L1, L2, L3) un vienā mazajā (S1) saimniecībā, turklāt sastopamības rādītāji starp saimniecībām būtiski atšķīrās. Ļoti bieži izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* raksturīga multirezistence, turklāt lielajās saimniecībās konstatēti plašāki multirezistences fenotipi. Visbiežāk izolētie ESBL kodējošie gēni bija *bla*_{TEM} un *bla*_{CTX-M}, kam sekoja *bla*_{SHV}. Mazajā saimniecībā dominēja gēns *bla*_{SHV} un tam bija raksturīga pozitīva asociācija ar novēroto rezistenci pret cefazidīmu, cefiksīmu un amoksicilīnu-klavulānskābi, savukārt gēns *bla*_{CTX-M} dominēja izolētos lielajās saimniecībās un tam bija pozitīva asociācija ar rezistenci pret cefaleksīnu un vairākām ne-bēta laktāma antibiotikām.

Sivēnu ēdināšanas pētījumā probiotikas palielināja *Lactobacillus* spp. skaitu tievajā un resnajā zarnā un samazināja *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu fekālijās sivēnu 35. dzīves dienā, savukārt augi samazināja *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaitu fekālijās 56. sivēnu dzīves dienā. Rezistentie *E. coli* (kam novēro rezistenci pret vismaz vienu antibiotiku), tika konstatēti nedaudz vairāk pirms pētījuma, salīdzinot ar noslēgumu visās pētījuma grupās. Turklāt augi samazināja rezistentu *E. coli* fenotipisko dažādību. Visās papildinātajās grupās tika uzlaboti zarnu histomorfoloģiskie rādītāji – zarnu bārkstīņu augstums; bārkstīņu augstuma un kriptu dziļuma attiecība; resnās zarnas kriptu dziļums; un proliferējošo (Ki67 pozitīvo) epitēlijsūnu skaits. Probiotiku iekļaušana diētā palielināja kausveida šūnu skaitu zarnu kriptās, kā arī palielināja skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu tievajā zarnā; taču augi samazināja kausveida šūnu un skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu blīvumu tukšās zarnas bārkstīņās. Probiotikas palielināja intraepitēliālo limfocītu skaitu, T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) relatīvo biežumu Peijera platēs un *lamina propria*. Ārstniecības augiem novēroja duālu ietekmi – no vienas puses tie samazināja intraepitēliālo limfocītu skaitu, taču palielināja T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) relatīvo biežumu Peijera platēs un resnās zarnas *lamina propria*. Probiotikas būtiski palielināja α -linolēnskābes un palmitoleīnskābes, bet samazināja stearīnskābes līmeni muskuļaudos.

Salīdzinot tīru komerciālo un Latvijā augušu lūpziežu (*Lamiaceae*) dzimtas augu ēterisko eļļu antibakteriālo efektivitāti pret fekālajiem ESBL producējošajiem *E. coli*, tika konstatēts, ka komerciālajām ēteriskajām eļļām bija augstāka inhibējošā un baktericīdā aktivitāte. Turklāt būtiski uzlabojās komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālā darbība, tās bagātinot ar nātrija hlorīdu vai kaprīlskābi. Tīrām ēteriskajām eļļām bija zemāka aktivitāte pret ESBL un multirezistentajiem (MDR) ESBL producējošiem *E. coli*, taču ēterisko eļļu bagātināšana ar kaprīlskābi un, īpaši nātrija hlorīdu, būtiski uzlaboja antibakteriālo efektivitāti pret ESBL un MDR ESBL producējošiem *E. coli*.

Promocijas darba noslēgumā ir formulēti desmit secinājumi un piecas praktiskās rekomendācijas. Promocijas darbs noformēts 140 lapaspusēs, darbā ir 23 tabulas, 30 attēli, kā arī pievienoti divi pielikumi. Literatūras sarakstā ietverti 340 informācijas avoti.

ANNOTATION

The doctoral thesis “Prevalence and reduction possibilities of resistant *Escherichia coli* in pigs” by Daiga Gāliņa was carried out during the period from 2014 to 2022 at the Institute of Food and Environmental Hygiene of the Latvia University of Life Sciences and Technologies (LLU) and at the Division of Molecular Biology and Microbiology of the Research Laboratory of Biotechnology of LLU. The study was carried out into three activities – one of them was dedicated to find out the prevalence of resistant *E. coli* in pigs in Latvia, while the other two were to reduction possibilities of resistance.

In the first activity, 615 samples of pig feces were collected from seven pig breeding farms in the Republic of Latvia. Subsequently, a bacteriological examination of the samples was carried out – 615 commensal *Escherichia coli* were isolated and their antibiotic resistance was determined. All of the obtained faecal samples of pigs were tested for the presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli*. Presumptive ESBL-producing *E. coli* were phenotypically and genotypically confirmed subsequently determining their resistance to antibiotics.

In the second activity, in one of the pig farms (No. L3), we randomly selected 4 litters containing sows with 14-day-old Landrace-Duroc crossbred piglets (n=44). The piglets of each litter were assigned to their own treatment groups: control group (C), probiotics group (P), probiotics and buckwheat bran group (PB) and herbal group (H). During the study, control group piglets received basal diet, P and PB groups received probiotics, that were added to the drinking water; but buckwheat bran and herbal supplement were added to the basal diet for the groups PB and H, respectively. The research period was 6 weeks. During this activity, the potential of probiotics and feed components of plant origin as an alternative solution to antimicrobial agents was evaluated, determining the effect of them on the general health of piglets, intestinal health, and the prevalence of resistant *E. coli*.

In the third activity, the *in vitro* antibacterial activity of the commercial and Latvian (the author of this doctoral thesis have obtained from medicinal plants during the hydrodistillation process) essential oils was compared against phenotypical and genotypic confirmed fecal ESBL producing *E. coli* isolated from pigs in the first activity of this study.

The hypothesis put forward in the thesis: bacteria *Escherichia coli* resistance to antibiotics is highly widespread in pig farming farms in Latvia and the use of probiotics, as well as herbal products, could limit the spread of *E. coli* and ESBL-producing *E. coli*.

The purpose of the thesis: to study the prevalence of resistant *Escherichia coli* in pigs in Latvia, to evaluate the possibilities of its reduction by using feed components and means of natural origin.

Tasks of the doctoral thesis:

1. find out the prevalence of the resistant to antibiotics *Escherichia coli* in pig farms in Latvia. To identify extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* occurrence in pigs;
2. evaluate the effect of supplementary feed containing probiotics and feed components of plant origin on the health of piglets and their intestines – prevalence of resistant *E. coli*, intestinal microbiot, histomorphological and immunological condition, meat quality;
3. to compare the antibacterial activity of Latvian and commercial essential oils *in vitro* against porcine faecal extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*, as well as to evaluate the use of essential oils enriched with caprylic acid and sodium chloride in the control of this resistant *E. coli*.

The personal contributions:

1. bacteriological examination of faecal samples (commensal indicator bacteria *E. coli* isolation and biochemical confirmation; testing samples for the presence of ESBL-producing *E. coli*, their phenotypic confirmation; *E. coli* and ESBL-producing *E. coli* determination of antimicrobial sensitivity (antibiotic resistance) against 12 and 18 antibiotics, respectively, preparation of isolated cultures for long-term storage);
2. collection of medicinal plants, preparation of a herbal supplement containing them for the implementation of the piglet feeding study;
3. bacteriological examination of the faeces and intestinal contents of obtained piglets (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp. determination of the number, isolation of *E. coli* and determination of its antimicrobial sensitivity (antibiotic resistance);
4. wild and cultivated medicinal plants in Latvia (*T. vulgaris*, *T. serpyllum* and *S. montana*) collection, extraction of essential oils using the hydrodistillation method;
5. examination of the antibacterial activity of Latvian and commercial essential oils, as well as commercial enriched (with caprylic acid and NaCl) essential oils *in vitro*.

To determine the prevalence of resistant *E. coli*, including the occurrence of extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli*, we collected faecal samples of pigs of different ages (4, 6, 8 and 12 weeks old) and sows from seven pig breeding farms in three regions of Latvia – Vidzeme, Pieriga and Zemgale; four of the farms were considered relatively large (number of sows 700-2100) and three were considered small (number of sows 15-40). We isolated commensal indicator bacteria *E. coli* from the faecal samples bacteriologically and tested their susceptibility to 12 antibiotics. We tested each collected sample for the presence of ESBL-producing *E. coli*, isolated the presumed colonies and then confirmed them phenotypically and genotypically by determining the presence of the beta-lactamase genes such as *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}. In confirmed ESBL-producing *E. coli*, susceptibility to 18 antibiotics was determined. We evaluated the differences of the prevalence of ESBL-producing *E. coli* between large and small farms, and among pigs of different ages, the more frequently observed resistance phenotypes and ESBL-encoding genes were characterized.

To evaluate the effect of probiotics and feed components of plant origin on the intestinal microbiota, including the spread of resistant *E. coli*, the health of pigs and their intestines, as well as meat quality, we selected four litters of 14-day-old Landrace-Duroc crossbred piglets (n=44) in farm No L3. Each litter of piglets was assigned into one of 4 research groups – control group (group C), probiotic group (group P), probiotic and buckwheat bran group (PB group) and herbal group (group H). During the study, we added a probiotics to the drinking water for the groups P and PB at certain concentrations depending on the age of the piglets (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, and 0.32% according to the 14th, 28th, 35th, 42nd, and 49th). In addition, piglets of group PB received a buckwheat bran supplement – 3% of the basic feed mass. Group H received a feed supplement of medicinal plants – plantain (*Plantago major* L.), nettle (*Urtica dioica* L.) and St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in a ratio of 1:1:1 in the amount of 1.5% of the basic feed mass. The research period was 6 weeks, i.e., from the 14th to the 56th day of piglet life. We investigated the impact of probiotics and feed components of plant origin on the haematological and serum biochemical parameters; faecal and intestinal microbiota (the number of *Enterobacteriaceae*, *E. coli* and *Lactobacillus* spp.) the prevalence of resistant *E. coli*; histomorphological measurements of the intestine; the number and density of goblet cells, including neutral and acidic mucin-producing goblet cells; epithelial cell proliferation and infiltration of lymphocytes (immunohistochemical analysis of the intestine); as well as fatty acid content in muscular tissue.

In order to evaluate the potential use of commercial and Latvian *Lamiaceae* plant-derived products (essential oils) to limit the spread of ESBL-producing *E. coli* on pig farms, we performed *in vitro* determination of the antimicrobial activity commercial essential oils and hydrodistillation-derived essential oils from medicinal plants grown in Latvia (breckland thyme

(*Thymus serpyllum* L.), common thyme (*Thymus vulgaris* L.) and mountain savory (*Satureja montana* L.). The chemical composition of essential oils was determined, the factors affecting their antibacterial activity were analysed, and the antibacterial efficiency of pure and supplemented (with caprylic acid and NaCl) commercial essential oils against faecal ESBL-producing *E. coli* was compared.

High level of resistance to tetracycline, ampicillin, trimethoprim, sulfamethoxazole-trimethoprim, and amoxicillin-clavulanic acid were observed in *E. coli*, isolated from the pig population and they were characterized by very diverse resistance phenotypes; a significantly higher prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* could be observed in large farms. The carriage of resistant *E. coli* in pigs decreased at the end of the production cycle, that is, significantly fewer resistant *E. coli* isolates were observed from fattening pigs. The presence of fecal ESBL-producing *E. coli* was confirmed on three large farms (L1, L2, L3) and one small (S1) farm, moreover, the rates of occurrence varied significantly between farms. Very often ESBL-producing *E. coli* was classified as multidrug-resistant, in addition, the isolates from the large farms had demonstrated more extensive MDR phenotypes. The most frequently detected ESBL-encoding genes were *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M}, followed by *bla*_{SHV}. The gene *bla*_{SHV} was dominant on the small farm and it characterized by a positive association with resistance to cefixime, ceftazidime and amoxicillin-clavulanic acid, while the gene *bla*_{CTX-M} was dominant in isolates on the large farms and it was positively associated with resistance to cephalixin and several non-beta-lactam antibiotics.

In the piglet feeding study, probiotics increased the number of *Lactobacillus* spp. in the small and large intestine and reduced the number of *Enterobacteriaceae* in the faeces on the 35th day of piglet life, while the herbal supplement reduced the number of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* in the faeces on the 56th day of piglet life. Resistant *E. coli* (to at least one antibiotic) were detected slightly more before the study compared to the conclusion in all study groups. Furthermore, the herbals reduced the phenotypic diversity of resistant *E. coli*. All of the supplemented groups showed an improvement of intestinal histomorphological parameters – the villus height; the villus height to crypt depth ratio in the *jejunum*; the crypt depth in the colon; and the number of proliferating (Ki67 positive) epithelial cells. The inclusion of probiotics in the basal diet was increased the total number of goblet cells in crypts of intestine, furthermore, increasing acidic mucin producing goblet cells in *jejunum*; in contrast the herbal supplement decreased the density of goblet cells and acidic mucin producing goblet cells in *jejunum* villi. Probiotics increased the number of intraepithelial lymphocytes, the relative frequency of T cell (CD3 positive cells) in Peyer's patches and *lamina propria*. Herbals had a dual effect – on the one hand, they reducing the number of intraepithelial lymphocytes, but increasing the relative frequency of T cell (CD3 positive cells) in the Peyer's patches, and the *lamina propria* of the colon. Probiotics significantly increased α -linolenic and palmitoleic acids, but decreased stearic acid levels in muscle tissue.

By comparing the antibacterial efficiency of pure commercial essential oils and the essential oils of *Lamiaceae* family plants grown in Latvia against faecal ESBL-producing *E. coli*, it was found that commercial essential oils had higher inhibitory and bactericidal activity. In addition, the antibacterial activity of commercial essential oils was significantly improved when they were enriched with sodium chloride or caprylic acid. Pure essential oils had lower activity against ESBL and multidrug-resistant (MDR) ESBL-producing *E. coli*, but enrichment of essential oils with caprylic acid and, especially sodium chloride, significantly improved antibacterial activity against ESBL and MDR ESBL-producing *E. coli*.

Ten conclusions and five practical recommendations have been formulated at the end of the doctoral thesis. There are 140 pages, 23 tables, 30 figures and attached two appendices. The bibliography contains 340 references.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	3
ANNOTATION.....	6
Darbā iekļauto tabulu saraksts	12
Darbā iekļauto attēlu saraksts	13
Darbā lietotie simboli un saīsinājumi	15
IEVADS	17
1. LITERATŪRAS APSKATS	21
1.1. <i>E. coli</i> patogenitātes rakturojums.....	21
1.2. Rezistentā <i>E. coli</i> raksturojums	24
1.2.1. <i>E. coli</i> rezistences ģenētiskie aspekti	24
1.2.2. Rezistences mehānismu raksturojums.....	25
1.2.3. Paplašināta spektra bēta-laktamāzes, to fenotipiskais raksturojums.....	26
1.2.4. Paplašināta spektra bēta-laktamāžu (ESBL) genotipiskais raksturojums un klasifikācija	26
1.2.5. Rezistentā un ESBL producējošā <i>E. coli</i> epidemioloģija.....	28
1.3. Barības piedevas kā alternatīva antibiotikām un veselības veicinātāji cūkām	32
1.3.1. Probiotiku ietekme uz sivēnu veselības stāvokli un attīstību.....	33
1.3.2. Griķu klijas kā diētisko šķiedru avots un to ietekme uz sivēnu veselības stāvokli un attīstību.....	34
1.3.3. Augu izcelsmes piedevu ietekme uz sivēnu veselības stāvokli	36
1.4. Ēteriskās eļļas un to antibakteriālā darbība.....	37
Literatūras apskata kopsavilkums	41
2. MATERIĀLS UN METODIKA	43
2.1. Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma.....	43
2.2. Materiāla raksturojums	46
2.2.1. Cūkkopības saimniecību raksturojums.	46
2.2.2. Sivēnu barības komponentu raksturojums	46
2.2.3. Ēdināšanas pētījuma sivēnu grupu raksturojums	47
2.2.4. Ēterisko eļļu raksturojums.....	47
2.3. Metodikas apraksts	48
2.3.1. Cūku fekāliju paraugu ieguve Latvijas cūkkopības saimniecībās.....	48
2.3.2. Sivēnu ēdināšanas pētījums un paraugu ieguves metodika.....	48
2.3.3. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana	51
2.3.4. ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes	54
2.3.5. Sivēnu zarnu paraugu histoloģiskā izmeklēšana.....	56
2.3.6. Sivēnu zarnu paraugu imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	58
2.3.7. Asins hematoloģiskā un seruma bioķīmiskā analīze.....	61
2.3.8. Taukskābju rādītāju noteikšana gaļas paraugos	61
2.3.9. Augu ēterisko eļļu ķīmiskā satura noteikšana	61
2.3.10. Augu ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaude	63
2.3.11. Datu statistiskā analīze	64
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI.....	66
3.1. Pret antibiotikām rezistentā <i>E. coli</i> izplatība cūkkopības saimniecībās	66
3.1.1. Biežāk lietotās antibiotikas cūku ārstēšanā un sivēnu diarejas profilaksē pētījumā iekļautajās saimniecībās	66

3.1.2. <i>E. coli</i> rezistence pret antibiotikām cūku populācijā	68
3.1.3. ESBL producējošo <i>E. coli</i> sastopamība pētījumā iekļautajās saimniecībās dažāda vecuma cūkām, tā antimikrobiālā rezistence.....	73
3.1.4. ESBL producējošo <i>E. coli</i> kodējošie gēni, sastopamības atšķirības lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās.	75
3.2. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas izbarošanas ietekme uz sivēnu veselības stāvokli un gremošanas trakta attīstību	78
3.2.1. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas ietekme uz hematoloģiskajiem un seruma bioķīmiskajiem rādītājiem.....	78
3.2.2. Barības komponentu ietekme uz fekāliju un zarnu satura mikrobiotu un pret antibiotikām rezistentā <i>E. coli</i> izplatību	78
3.2.3. Tievo un resno zarnu histomorfoloģiskā analīze	81
3.2.4. Epitēlija šūnu proliferācijas (Ki67) un T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) infiltrācijas imūnhistokīmiskā analīze.	85
3.2.5. Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu <i>m. Longissimus thoracis et lumborum</i> muskuļaudos 56. dienu veciem sivēniem	87
3.3. Ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums, antibakteriālā darbība un dažādu piedevu ietekme uz ēterisko eļļu efektivitāti pret ESBL producējošiem <i>E. coli</i>	88
3.3.1. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums	88
3.3.2. Komerciālo un Latvijas ēterisko eļļu antibakteriālā aktivitāte pret <i>E. coli</i>	90
3.3.3. Kaprīlskābes un sāls piedevu ietekme uz ēterisko eļļu antibakteriālo darbību pret <i>E. coli</i>	91
3.3.4. Ēterisko eļļu un bagāināto ēterisko eļļu antibakteriālās aktivitātes salīdzinājums pret ESBL producējošiem/ne-producējošiem <i>E. coli</i> un multirezistentajiem/ne-multirezistentajiem <i>E. coli</i>	92
4. DISKUSIJA	94
4.1. Pret antibiotikām rezistentā <i>E. coli</i> un ESBL producējošā <i>E. coli</i> izplatība cūkām Latvijā	94
4.1.1. Biežāk lietotie antimikrobiālie līdzekļi cūkkopības saimniecībās, to ietekme uz rezistentā <i>E. coli</i> izplatību cūku populācijā.....	94
4.1.2. ESBL producējošā <i>E. coli</i> sastopamība lielajās un mazajās saimniecībās, dažāda vecuma cūkām.....	96
4.1.3. ESBL producējošā <i>E. coli</i> antimikrobiālā rezistence	98
4.1.4. ESBL kodējošo gēnu sastopamība izolētajos <i>E. coli</i> cūkkopības saimniecībās ...	100
4.1.5. ESBL kodējošo gēnu asociācijas ar fenotipisko rezistenci	100
4.2. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas izbarošanas ietekme uz sivēnu veselību	101
4.2.1. Barības komponentu ietekme uz asins rādītāju izmaiņām sivēniem.....	101
4.2.2. Barības komponentu ietekme uz zarnu trakta mikrobiotu un rezistentā <i>E. coli</i> izplatību.....	102
4.2.3. Zarnu histomorfoloģiskais raksturojums barības komponentu ietekmē	105
4.2.4. Barības komponentu ietekme uz T limfocītu populācijas izmaiņām tievajā un resnajā zarnā.....	108
4.2.5. Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu muskuļaudos	110
4.3. Ēterisko eļļu antibakteriālā darbība un to piedevu (kaprīlskābes, NaCl) ietekme uz ēterisko eļļu efektivitāti pret ESBL producējošajiem <i>E. coli</i>	111
4.3.1. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums	111
4.3.2. Komerciālo un Latvijā augušu augu ēterisko eļļu antibakteriālās darbības salīdzinājums pret <i>E. coli</i>	113

4.3.3. Kaprīlskābes un NaCl piedevu ietekme uz ēterisko eļļu antibakteriālo darbību pret <i>E. coli</i>	114
4.3.4. Ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu antibakteriālās aktivitātes salīdzinājums pret ESBL producējošiem/ne-producējošiem <i>E. coli</i>	115
SECINĀJUMI	117
PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS	119
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	120
PIELIKUMI.....	141

Darbā iekļauto tabulu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1.	Ēterisko eļļu komponentu un sulfanilamīda minimālā inhibējošā koncentrācija (mg mL^{-1}) pret dažādu sugu baktērijām	38
3.1.	Cūkkopības saimniecību raksturojums, profilaktiskie pasākumi un visbiežāk lietotās antibiotikas cūku ārstēšanai	67
3.2.	Pret antibiotikām rezistentā <i>E. coli</i> izplatība (%) cūku populācijā	68
3.3.	Izolēto komensiālo <i>E. coli</i> rezistences fenotipu dažādība, $n=615$	69
3.4.	Pret antibiotikām (AB) rezistentā <i>E. coli</i> izplatība (%) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās	70
3.5.	Pret antibiotikām rezistentā <i>E. coli</i> izplatība (%) dažāda vecuma cūkām	71
3.6.	Atšķirīga rezistences līmeņa un multirezistento (MDR) <i>E. coli</i> izplatība (%), (n) lielajās un mazajās saimniecībās	72
3.7.	Atšķirīga rezistences līmeņa un multirezistento (MDR) <i>E. coli</i> izplatība (%), (n) dažāda vecuma cūkām	72
3.8.	ESBL producējošu <i>E. coli</i> sastopamība (%), (n) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās	73
3.9.	ESBL producējošu <i>E. coli</i> sastopamība (%), (n) dažāda vecuma cūkām	73
3.10.	Izolēto ESBL producējošo <i>E. coli</i> bēta-laktāmu rezistences fenotipu un kodēto ESBL gēnu sadalījuma biežums, n	77
3.11.	Statistiski nozīmīgas asociācijas starp ESBL kodējošiem gēniem un fenotipiski konstatēto antibiotiku rezistenci ESBL producējošiem <i>E. coli</i> izolātiem	77
3.12.	Barības komponentu ietekme uz hematoloģiskajiem un seruma bioķīmiskajiem rādītājiem noslēdzot sivēnu ēdināšanas pētījumu (56. diena), $\bar{x} \pm \text{SE}$	78
3.13.	Barības komponentu ietekme uz <i>Enterobacteriaceae</i> dzimtas baktēriju un <i>E. coli</i> skaitu fekālijās 14., 35. un 56. sivēnu dzīves dienā, $\bar{x} \pm \text{SE}$	79
3.14.	Barības komponentu ietekme uz <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Escherichia coli</i> un <i>Lactobacillus</i> spp. skaitu tievās un resnās zarnas saturā, $\bar{x} \pm \text{SE}$	79
3.15.	Antibiotiku rezistentā <i>E. coli</i> sastopamība sivēniem pirms un pēc sivēnu ēdināšanas pētījuma, n , (%)	80
3.16.	Izolēto rezistento <i>E. coli</i> fenotipiskā dažādība (n) fekālijās 56 dienu veciem sivēniem	80
3.17.	Barības komponentu ietekme uz tievās (<i>jejunum</i>) un resnās (<i>colon</i>) zarnas bārktīņu un kriptu morfometriskajiem rādītājiem, $\bar{x} \pm \text{SE}$	83
3.18.	Barības komponentu ietekme uz kausveida šūnu skaitu un blīvumu tievās (<i>jejunum</i>) un resnās (<i>colon</i>) zarnas bārktīņās un kriptās, $\bar{x} \pm \text{SE}$	84
3.19.	Barības komponentu ietekme uz skābo un neitrālo mukopolisaharīdu producējošo kausveida šūnu skaitu un blīvumu tievās (<i>jejunum</i>) un resnās (<i>colon</i>) zarnas bārktīņās un kriptās, $\bar{x} \pm \text{SE}$	84
3.20.	Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu* ($\bar{x} \pm \text{SE}$) <i>m. Longissimus thoracis et lumborum</i> muskuļaudos 56. dienu veciem sivēniem	87
3.21.	Komerciālo un laboratorijas apstākļos iegūtu ēterisko eļļu galvenie ķīmiskie savienojumi* un identificēto molekulāro klašu kopējais daudzums, $\bar{x} \pm \text{SD}$	89

3.22.	Komerčiālo un Latvijas ēterisko eļļu minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā baktericīdā koncentrācija (MBC pie 95% un 99.5%) pret references <i>E. coli</i> un <i>E. coli</i> , izolētiem no cūku fekālijām, $\bar{x} \pm SE$	90
-------	--	----

Darbā iekļauto attēlu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1.	Antimikrobiālās rezistences epidemioloģija apkārtējā vidē	31
2.1.	Pētījuma shēma	45
2.2.	Ēterisko eļļu ieguve ar hidrodestilācijas metodi, izmantojot Dīna-Stārka destilācijas aparātu	48
2.3.	Sagatavotie aizgaldi sivēnu ēdināšanas pētījuma grupu sivēniem pēcatšķiršanas periodā	49
2.4.	Kombinētais disku tests fenotipiskai ESBL producējošu <i>E. coli</i> apstiprināšanai	52
2.5.	Disku difūzijas metode <i>E. coli</i> jutības un rezistences noteikšanai pret 12 antibiotikām	52
2.6.	ESBL producējošo <i>E. coli</i> DNS elektroforēze agarozes gēlā	55
2.7.	Tievās (<i>jejunum</i> (a)) un resnās (<i>colon</i> (b)) zarnas gļotādas apvidus morfometrisko mērījumu iegūšanas tehnika 56. dienu vecam sivēnam, H&E, 100×	57
2.8.	Kausveida šūnas tievās (<i>jejunum</i> (a)) un resnās (<i>colon</i> (b)) zarnas gļotādas apvidus griezumā 56. dienu vecam sivēnam, H&E, 200×	58
2.9.	Neitrālo (a) un skābo (b) mukopolisaharīdu producējošu kausveida šūnu diferencēšana tievās zarnas (<i>jejunum</i>) bārkstiņu apvidus griezumā 56. dienu vecam sivēnam a) PAS, b) AB (pH 2.5), 400×	58
2.10.	Proliferējošo epitēlija (Ki67 pozitīvo) šūnu lokalizācija tievās (<i>jejunum</i> (a)) un resnās (<i>colon</i> (b)) zarnas gļotādas kriptās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, a) 200×, b) 400×	60
2.11.	Intraepiteliālo T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) lokalizācija tievās (<i>jejunum</i> (a)) zarnas gļotādas bārkstiņās un resnās (<i>colon</i> (b)) zarnas gļotādas kriptās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, 400×	60
2.12.	T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) relatīvā biežuma noteikšana dažādās tievās (<i>jejunum</i> (a)) un resnās (<i>colon</i> (b)) zarnas struktūrās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, 100×	61
2.13.	<i>T. serpyllum</i> ēteriskās eļļas, kas ekstrahēta ar hidrodestilācijas metodi laboratorijas apstākļos, viegli gaistošo komponentu gāzu hromatogramma	62
2.14.	Ēterisko eļļu minimālās baktericīdās koncentrācijas (MBC) kontrole un vizuāla dokumentēšana, pielietojot 0.01% w/v resazurīna nātrija sāls ūdens šķīdumu	64
3.1.	Antibiotiku rezistences izplatība (%) izolētajiem ESBL producējošajiem <i>E. coli</i> lielo un mazo cūku saimniecību grupās	74
3.2.	Multirezistences līmeņu sadalījums (%) ESBL producējošiem <i>E. coli</i> , izolētiem no dažāda vecuma cūkām un saimniecībām	75
3.3.	ESBL kodējošo gēnu un to kombinācijas sadalījums (%) izolētajos ESBL producējošos <i>E. coli</i> cūku populācijā	75
3.4.	ESBL kodējošo gēnu sadalījums (%) izolētajiem <i>E. coli</i> lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās	76

3.5.	Rezistentā <i>E. coli</i> sadalījums (%) pa rezistences līmeņiem 14 dienu veciem sivēniem (pirms pētījuma) un 56 dienu veciem sivēniem (noslēdzot pētījumu) C, P, PB un H grupās	81
3.6.	Histoloģiskās atradnes 56 dienu vecu sivēnu tievās zarnas griezumos, H&E	82
3.7.	Histoloģiskās atradnes 56 dienu vecu sivēnu resnās zarnas griezumos, H&E	82
3.8.	Barības komponentu ietekme uz Ki67 pozitīvo epitēlija šūnu blīvumu ($\bar{x} \pm SE$) sivēnu tievās (<i>jejunum</i>) un resnās (<i>colon</i>) zarnas kriptās	85
3.9.	Barības komponentu ietekme uz intraepiteliālo CD3 pozitīvo ($CD3^+$) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) sivēnu tievajā (<i>jejunum</i>) un resnajā (<i>colon</i>) zarnā	86
3.10.	Barības komponentu ietekme uz CD3 pozitīvo ($CD3^+$) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) tievās (<i>jejunum</i>) un resnās (<i>colon</i>) zarnas gļotādas <i>lamina propria</i> (LP) daļā	86
3.11.	Barības komponentu ietekme uz CD3 pozitīvo ($CD3^+$) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) tievās zarnas (<i>jejunum</i>) Peijera platēs un resnās zarnas (<i>colon</i>) zemgļotādas daļā	87
3.12.	Komerčiālo un Latvijas ēterisko eļļu MIC vērtību ($\bar{x} \pm SE$) salīdzinājums pret references <i>E. coli</i> ATCC 25922 un <i>E. coli</i> , izolētiem no cūku fekālijām	91
3.13.	Kaprīlskābes un NaCl piedevu ietekme uz komerčiālo ēterisko eļļu antibakteriālo darbību (MIC, ($\bar{x} \pm SE$) pret <i>E. coli</i>	92
3.14.	Ēterisko un bagātināto ēterisko eļļu (ēteriskā eļļa +3% NaCl un ēteriskā eļļa+kaprīlskābe) antibakteriālās aktivitātes (MIC, ($\bar{x} \pm SE$) salīdzinājums pret ESBL producējošiem un ESBL ne-producējošiem <i>E. coli</i>	93
3.15.	Ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu (ēteriskā eļļa +3% NaCl un ēteriskā eļļa+kaprīlskābe) antibakteriālās aktivitātes (MIC, ($\bar{x} \pm SE$) salīdzinājums pret multirezistentajiem (MDR) un ne-multirezistentajiem <i>E. coli</i> (ne-MDR)	93

Darbā lietotie simboli un saīsinājumi

Saīsinājums	Skaidrojums latviski	Skaidrojums angliiski
χ^2	Hī-kvadrāta tests	<i>Chi-Square test</i>
$\bar{x}$	Vidējais aritmētiskais	<i>Mean</i>
AB	Alciānzilā reakcija	<i>Alcian blue stain</i>
ALP	Sārmainā fosfatāze	<i>Alkaline phosphatase</i>
ASAT	Aspartāta aminotransferāze	<i>Aspartate aminotransferase</i>
ATF	Adenozīntrifosforskābe	<i>Adenosine triphosphate</i>
bp	Bāzes pāris	<i>Base pair</i>
CD	Kriptas dziļums	<i>Crypt depth</i>
CD3	Specifiskais T limfocītu proteīns	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CDT	Kombinēto disku tests	<i>Combined disc test</i>
CO ₂	Oglekļa dioksīds	<i>Carbon dioxide</i>
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	<i>Deoxyribonucleic acid (DNA)</i>
EO	Ēteriskā eļļa	<i>Essential oil</i>
ES	Eiropas Savienība	<i>European Union</i>
ESBL	Paplašinātā spektra bēta-laktamāze	<i>Extended spectrum beta-lactamase</i>
ETEC	Enterotoksigēnais <i>E. coli</i>	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>
FAO	Pārtikas un lauksaimniecības organizācija	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GALT	Ar zarnu traktu saistītie limfoīdie audi	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
Glu	Glutamīns	<i>Glutamine</i>
H&E	Hematoksilīna-Eozīna metode	<i>Hematoxylin and eosin stain</i>
IEL	Intraepiteliālie limfocīti	<i>Intraepithelial lymphocytes</i>
IgA	Imūnglobulīns A	<i>Immunoglobulin A</i>
IL	Interleikīni	<i>Interleukines</i>
Ki67	Specifisks kodolproteīns šūnu dzīvescikla aktīvajām fāzēm	<i>Nuclear protein Ki67</i>
kvv	Koloniju veidojošās vienības	<i>Colony forming units</i>
Lys	Lizīns	<i>Lysine</i>
LPS	Endotoksīns, gramnegatīvu baktēriju ārējās membrānas lipopolisaharīds	<i>Bacterial lipopolysaccharides</i>
LTA	Lipoteihskābe	<i>Lipoteichoic acid</i>
MBC	Minimālā baktericīdā koncentrācija	<i>Minimum bactericidal concentration</i>
MDR	Multirezistence	<i>Multiple drug resistance (MDR)</i>
MGE	Mobilie ģenētiskie elementi	<i>Mobile genetic element</i>
MIC	Minimālā inhibējošā koncentrācija	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
mRNS	Matricas ribonukleīnskābe	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MUC2	Mucīns 2	<i>Mucin 2</i>
MUFA	Mononepiesātinātās taukskābes	<i>Monounsaturated fatty acid</i>
NaCl	Nātrija hlorīds	<i>Sodium chloride</i>

NADH	Nikotīnamīda adenīna dinukleotīds+ūdeņradis	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide+ hydrogen</i>
PAS	Perjodskābes-Šiffa reakcija	<i>Periodic acid-Schiff stain</i>
PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Ūdeņraža jonu koncentrācijas negatīvais logaritms	<i>The negative logarithm of the hydrogen ion concentration</i>
PP	Peijera plates	<i>Peyer`s patches</i>
PUFA	Polinepiesātinātās taukskābes	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
PVO	Pasaules Veselības organizācija	<i>World Health Organization</i>
QS	Kvorum noteikšana	<i>Quorum sensing</i>
SCFA	Īsās ķēdes taukskābes	<i>Short chain fatty acids</i>
SD	Standartnovirze	<i>Standard deviation</i>
SE	Standartklūda	<i>Standard error</i>
Ser	Serīns	<i>Serine</i>
SFA	Piesātinātās taukskābes	<i>Saturated fatty acid</i>
TGF	Transformējošais augšanas faktors	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T līdzētājšūnas	<i>T helper cells</i>
TNF	Tumora nekrozes faktors	<i>Tumor necrosis factor</i>
VH	Bārktiņas augstums	<i>Villus height</i>
VW	Bārktiņas platums	<i>Villus width</i>
ZnO	Cinka oksīds	<i>Zinc oxide</i>

IEVADS

Escherichia coli ir fakultatīvi anaeroba baktērija, plaši pārstāvēta zarnu traktā vairumam dzīvnieku sugu. Jauniem dzīvniekiem *E. coli* ir komensālis – ātri kolonizē zarnu traktu un kļūst par normālās mikrobiotas daļu, taču daļa no *E. coli* celmiem ir patogēni.

Cūkām nozīmīgākie ir enterotoksigēnie *E. coli* (ETEC), enteropatogēnie *E. coli* (EPEC), šiga-toksigēnie *E. coli* (STEC) un ekstraintestināli patogēnie *E. coli* (ExPEC), tai skaitā, septicēmiskie *E. coli* (SEPEC) celmi. Īpaši aktuāla ir kolibakterioze, ko izraisa enterotoksigēnie *E. coli* celmi zīdēj- un atšķirtiņiem sivēniem. Ātraudzīgus sivēnus skar hemolītiskais (STEC) *E. coli*, kas izraisa sivēnu tūskas slimību. ExPEC un EPEC ir kā oportūniski patogēni un ir daļa no normālās zarnu mikrobiotas (Gyles & Fairbrother, 2010).

E. coli patogenitāte ir saistīta ar virulences gēniem, kas ir kodēti mobilajos ģenētiskajos elementos (Gyles & Fairbrother, 2010), turklāt būtiska nozīme ir predisponējošiem faktoriem, t.i., pasīvās imunitātes nepietiekamībai, neatbilstoši higiēnai, jaundzimušā dzīvnieka statusam un stresa faktoriem, piemēram, sivēnu atšķiršanas periodam un intensīvajai cūkkopībai, kas ir dominējošais saimniekošanas veids gan pasaulē, gan Latvijā. Augsts cūku blīvums un šīs sugas dzīvnieku jutība uz stresa faktoriem veicina slimību koncentrēšanos un transmisiju.

Cūku audzētāji tradicionāli ir centušies uzlabot gremošanas trakta dabiskās aizsargfunkcijas, izmantojot antibiotikas kā augšanas veicinātājus (Cromwell, 2002), taču tas ir sekmējis arī baktēriju rezistenci pret antibakteriālajiem preparātiem (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Gremošanas traktā esošajām *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām, tostarp *E. coli*, raksturīgs konjugācijas jeb horizontālais rezistences pārnese mehānisms, kas spēj savstarpēji apmainīties ar plazmīdām gan savas sugas robežās, gan arī starp baktēriju sugām. Plazmīdās bieži ir inkorporēti daudzi rezistences gēni, tāpēc baktērijām var ātri veidoties multirezistence (Boerlin & White, 2013).

Pieaugot bažām par antibiotiku rezistentu baktēriju globālo izplatību un to radīto risku sabiedrības veselībai, kopš 2006. gada ir aizliegts lietot antibiotikas kā augšanas veicinātājus dzīvniekiem, tostarp, cūkām. Neskatoties uz to, ka ES antibiotiku kā augšanas veicinātāju lietošana ir ierobežota, vairāku pētnieku darbi (Bednorz et al., 2013; Haenni et al., 2014; Von Salviati et al., 2014) liecina par augstu rezistentā *E. coli* izplatību un pieaugošo aktualitāti, īpaši lielu uzmanību pievēršot paplašināta spektra bēta laktamāzes (ESBL) producējošajam *E. coli*, kura izdalītie fermenti hidrolizē un inaktivē vairumu no bēta-laktāma antibiotikām, tostarp 3. un 4. paaudzes cefalosporīnus, kurus PVO ir atzinusi kā „kritiski svarīgas antibiotikas humānajā medicīnā”.

Pasaules Veselības organizācija 2014. gada pārskata ziņojumā par antibiotiku rezistenci atklāj, ka tā ir „lielākais globālais drauds” cilvēku veselībai, jo baktēriju rezistence pret antibiotikām arvien pieaug, radot risku „post-”, jeb „pēc antibiotiku ēras” attīstībai, kad cilvēki mirst no vienkāršām infekcijām, kuras bijis iespējams ārstēt desmitiem gadu ilgi (WHO, 2015).

Turklāt, kā ziņo *Global Trends* par antibiotiku lietošanu pārtikā izmantojamajiem dzīvniekiem, vislielākais antimikrobiālo līdzekļu patēriņš uz kilogramu dzīvmasas ir cūkām, apsteidzot vistas un liellopus (Van Boeckel et al., 2015). Vissvarīgākais ir tas, ka rezistentajām baktērijām izdaloties no makroorganisma, tiek piesārņota vide, tādējādi apdraudot citus dzīvniekus un cilvēkus, un, tā kā cūkas ir produktīvie dzīvnieki, pastāv augsts risks rezistentajām baktērijām nokļūt arī pārtikas ķēdē (WHO, 2015).

Antibiotiku kā augšanas stimulatoru aizliegums ir radījis nepieciešamību pēc efektīviem alternatīvo līdzekļu risinājumiem (Y. Liu et al., 2018; Stein & Kil, 2006). Mūsu pētījumā tika pievērsta uzmanība probiotiku un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmei ne tikai uz sivēnu un to zarnu veselību, bet arī ietekmei uz rezistentā *E. coli* izplatību fekālijās. Mūsaprāt, ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes salīdzinājums pret dažāda rezistences līmeņa cūku *E. coli* izolātiem *in vitro* sekmētu to plašākas izmantošanas iespējas rezistentu *E. coli* kontrolē.

Uzsākot pētījumu, izvirzījām sekojošas **aizstāvamās tēzes**:

1. Latvijas cūkkopības saimniecībās ir augsta antibiotiku rezistentā *E. coli* izplatība, turklāt tā būtiski atšķiras starp saimniecībām un cūku vecuma grupām;
2. atsevišķās cūkkopības saimniecībās ir augsta ESBL producējošā *E. coli* sastopamība, bieži tiem novēro plašus multirezistences (MDR) fenotipus;
3. atsevišķiem ESBL kodējošiem gēniem novēro pozitīvas asociācijas ar noteiktu antibiotiku izraisītu fenotipisko rezistenci, turklāt gēna *bla*_{CTX-M} klātbūtne nodrošina *E. coli* plašākus MDR fenotipus;
4. dabiskas izcelsmes barības komponenti (probiotikas, probiotikas+griķu klijas, augu piedeva) uzlabo sivēnu un to zarnu veselību – modulējot zarnu mikrobiotu, uzlabojot zarnu gļotādas histomorfoloģiskos rādītājus un ietekmējot T limfocītu izplatību tievās zarnas gļotādā, Peijera platēs, kā arī augus saturošas barības sastāvdaļas samazina *E. coli* skaitu un tā fenotipiskās rezistences dažādību;
5. Latvijā augušu *Lamiaceae* dzimtas augu ēteriskās eļļas raksturojas ar zemāku antibakteriālo darbību pret cūku komensiālajiem *E. coli* nekā komerciālās ēteriskās eļļas;
6. komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālā darbība pret *E. coli* būtiski uzlabojas, bagātinot tās ar kaprīlskābi vai 3% NaCl piedevu.

Promocijas darbā izvirzītā hipotēze: baktērijas *Escherichia coli* rezistence pret antibiotikām ir augsti izplatīta cūkkopības saimniecībās Latvijā un probiotiku, kā arī augu izcelsmes produktu lietošana varētu ierobežot *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* izplatību.

Promocijas darba mērķis: izpētīt rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkām Latvijā, izvērtēt tās samazināšanas iespējas, izmantojot dabiskas izcelsmes barības komponentus un līdzekļus.

Mērķa sasniegšanai izvirzītie **promocijas darba uzdevumi**:

1. noskaidrot pret antibiotikām rezistentā *Escherichia coli* izplatību cūkkopības saimniecībās Latvijā. Noteikt paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* sastopamību cūkām;
2. izvērtēt probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz sivēnu un to zarnu veselību – rezistentā *E. coli* izplatību, zarnu mikrobiotu, histomorfoloģisko un imunoloģisko stāvokli, gaļas kvalitāti;
3. salīdzināt Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālo darbību *in vitro* pret cūku fekālajiem paplašināta spektra bēta-laktamāzi (ESBL) producējošiem *E. coli*, kā arī izvērtēt ar kaprīlskābi un nātrija hlorīdu bagātināto ēterisko eļļu izmantošanu šo rezistentu *E. coli* kontrolē.

Pētījuma zinātniskā novitāte

1. Iegūti oriģināli dati par antibiotiku rezistentā, multirezistentā un paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* sastopamību cūku audzēšanas saimniecībās Latvijā, to izplatības atšķirībām lielajās un mazajās saimniecībās un dažāda vecuma cūkām.
2. Iegūti oriģināli dati par ESBL producējošā *E. coli* fenotipisko rezistenci, kā arī par multirezistences fenotipu izplatību starp ESBL producējošiem *E. coli*, kas izolēti no cūkām Latvijā.
3. Noteicām *E. coli* izplatītākos ESBL kodējošos gēnus (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} un *bla*_{SHV}), to sadalījuma atšķirības lielajās un mazajās cūku saimniecībās.
4. Iegūti oriģināli dati par statistiski nozīmīgām asociācijām starp ESBL kodējošajiem gēniem un fenotipiski konstatēto antibiotiku rezistenci cūku fekālajiem *E. coli*.

5. Iegūti oriģināli dati par “ProbioHelp” papildbarības, probiotiku+griķu (*Fagopyrum esculentum*) kliju un augu barības sastāvdaļu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) ietekmi uz 14-56 dienu vecu sivēnu zarnu satura un fekāliju mikrobiotas izmaiņām, rezistentā *E. coli* izplatību, tievās un resnās zarnas gļotādas struktūru histomorfoloģiskajiem mērījumiem, kausveida šūnu skaitu un to sekretētajiem mucīniem, epitēlija šūnu proliferāciju (Ki67) un T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) infiltrāciju tievās un resnās zarnas gļotādas, zemgļotādas un Peijera plašu struktūrās, kā arī noteikta ietekme uz taukskābju saturu muskuļaudos.
6. Pirmo reizi Latvijā noteikta un salīdzināta komerciāli pieejamo un Latvijā augušu augu (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) ēterisko eļļu antibakteriālā efektivitāte pret komensiālo *E. coli*, kas izolēti no cūkām; vērtēta šo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva ietekme uz antibakteriālo darbību.
7. Pirmo reizi izvērtēta ar kaprīlskābi un 3% NaCl bagātināto komerciālo ēterisko eļļu (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) antibakteriālā darbība pret komensiālo *E. coli*, kas iegūts no cūkām; noteikta šo kombināciju antibakteriālā efektivitāte pret dažādiem *E. coli* rezistences līmeņiem (ESBL producējošiem/ne-producējošiem *E. coli* un multirezistentiem/ne-multirezistentiem *E. coli*).

Zinātniskā darba aprobācija

Publikācijas, žurnālos, kas indeksētas **SCOPUS** un/vai **Web of SCIENCE** datu bāzēs:

1. **Gāliņa D.**, Radenkovs V., Kviesis J., Valdovska A. Effect of Essential Oils Supplemented with Caprylic Acid and Sodium Chloride against Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs. *Antibiotics*, 2022, 11(4), 461. (*Q2* ranga zinātniskais žurnāls)
2. **Gāliņa D.**, Balins A., Valdovska A. The Prevalence and Characterization of Fecal Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs on Farms of Different Sizes in Latvia. *Antibiotics*, 2021,10(9), 1099. (*Q2* ranga zinātniskais žurnāls)
3. **Gāliņa D.**, Ansonskā L., Valdovska A. Effect of probiotics and herbal products on intestinal histomorphological and immunological development in piglets. *Veterinary Medicine International*, 2020, 3461768. (*Q2* ranga zinātniskais žurnāls)

Publikācijas konferenču ziņojumu izdevumos, kas indeksēti **Web of Science** Conference Proceedings Citation Index un/vai **SCOPUS**:

4. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Effect of probiotics and herbals on health and shedding of resistant *Escherichia coli* in piglets. Research for rural development 2017, annual 23rd international scientific conference proceedings, 2017,1, 251.-258. (*Web of Science* raksts)
5. Valdovska A., **Gāliņa D.**, Krasnova I., Segliņa D. Antibacterial activity of some plants of traditional herbal medicine in vitro against *Escherichia coli* originated from Liquid pig manure. ACM's International Conference Proceedings Series 2017, Part F127267, 56-61. (*Scopus* raksts)

Publikācija **citos žurnālos**:

6. Valdovska A., **Gāliņa D.** Ārstniecības augi un probiotikas kā antibiotiku alternatīva. *AgroTops*. 2017,2, 67.-69. (*Populārzinātniskais raksts*)

Tēzes **konferenču rakstu krājumos**:

7. **Gāliņa D.**, Tračevska T., Valdovska A. The antimicrobial activity of eight essential oils against ESBL *Escherichia coli* isolated from pigs. *Medicina*. Vol. 55(1): International Scientific Conference on Medicine: 77 International Scientific Conference of the University of Latvia. 2019, 119. (*Kopsavilkums*)

8. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Challenge of the probiotics on growth performance and intestinal health in piglets. 26th NJF congress "Agriculture for the next 100 years": programme and summaries of presentation, 2018, 98. (*Kopsavilkums*)
9. Jonkus D., Ilgaža A., Valdovska A., Liepa L., Paura L., Degola L., Cielava L., Petrovska S., Smiltiņa D., Ruska D., Kļaviņa I., Viduža M., **Gāliņa D.**, Jonova S., Gatiņa L., Kovaļenko K., Ilgažs A. Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai. IV Pasaules latviešu zinātnieku kongress: tēzes, 2018; 24.-25. (*Kopsavilkums*)
10. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Comparison of a mixture of probiotics and its combination with buckwheat bran and herbals for piglet immune system, intestinal microflora and prevalence of resistant *Escherichia coli*. International scientific conference on Probiotics and Prebiotics: proceedings, 2016, 94-95. (*Kopsavilkums*)
11. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Impact of zinc feed supplementation of piglets to the proportion of multidrug resistant *Escherichia coli*. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015: book of abstracts, 2015, 345. (*Kopsavilkums*)

Ziņojumi zinātniskajās konferencēs:

1. **Gāliņa D.**, Tračevska T., Valdovska A. The antimicrobial activity of eight essential oils against ESBL *Escherichia coli* isolated from pigs. International Scientific Conference on Medicine: 77 International Scientific Conference of the University of Latvia, 22. februāris, 2019. gads, Rīga, Latvija. (*stenda ziņojums*)
2. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Challenge of the probiotics on growth performance and intestinal health in piglets. 26th NJF congress "Agriculture for the next 100 years", 27-29. jūnijs, 2018. gads, Kauņa, Lietuva. (*stenda ziņojums*)
3. Jonkus D., Ilgaža A., Valdovska A., Liepa L., Paura L., Degola L., Cielava L., Petrovska S., Smiltiņa D., Ruska D., Kļaviņa I., Viduža M., **Gāliņa D.**, Jonova S., Gatiņa L., Kovaļenko K., Ilgažs A. Vietējās izcelsmes slaucamo govju un cūku saimnieciski nozīmīgo pazīmju ģenētiskā izpēte kvalitatīvu pārtikas produktu ražošanai. IV Pasaules latviešu zinātnieku kongress, 18.-20. jūnijs, 2018. gads, Rīga, Latvija. (*stenda ziņojums*)
4. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Effect of probiotics and herbals on health and shedding of resistant *Escherichia coli* in piglets. Research for rural development 2017: annual 23rd international scientific conference, Latvia University of Agriculture, 17-19. maijs, 2017. gads, Jelgava, Latvija. (*mutisks ziņojums*)
5. Valdovska, A., **Gāliņa D.**, Krasnova I., Segliņa D. Antibacterial activity of some plants of traditional herbal medicine in vitro against *Escherichia coli* originated from Liquid pig manure. 7th International conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2017), 21.-23. janvāris, 2017. gads, Bangkoka, Taizeme. (*mutisks ziņojums*)
6. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Comparison of a mixture of probiotics and its combination with buckwheat bran and herbals for piglet immune system, intestinal microflora and prevalence of resistant *Escherichia coli*. International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, 21.-23. jūnijs, 2016. gads, Budapešta, Ungārija. (*stenda ziņojums*)
7. **Gāliņa D.**, Valdovska A. Impact of zinc feed supplementation of piglets to the proportion of multidrug resistant *Escherichia coli*. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld2015, University of Barcelona Barselona, 28.-30. oktobris, 2015. gads, Barselona, Spānija. (*stenda ziņojums*)

Patents:

WIPO/PCT patents WO 2019/229507 A1 "Pig feed additive for prophylaxis of antibiotic-resistant *E. coli*". (starptautiskā publicēšanas diena 05.12.2019.) (Patent Cooperation Treaty Application)

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *E. coli* patogenitātes rakturojums

Escherichia coli (*E. coli*) pieder pie *Enterobacteriaceae* dzimtas. *Escherichia* ģintī ir deviņas sugas (Meier-Kolthoff et al., 2022), bet izplatītākā un patogenitātes ziņā būtiskākā ir *E. coli*. Tā ir Gram-negatīva, nūjiņas formas baktērija, kas no fakultatīvi anaerobajiem organismiem ir visplašāk pārstāvēta zarnu traktā (Gyles & Fairbrother, 2010).

Jau pirmajās dzīves stundās jaundzimušo sivēnu sterilais gremošanas trakts tiek kontaminēts ar *E. coli* no sivēnmātes un apkārtējās vides un šī baktērija kļūst par daļu no normālās mikrobiotas visu cūku dzīves laiku. *E. coli* koncentrācija ir zemāka tievajā zarnā, bet tās skaits pakāpeniski palielinās un maksimumu sasniedz dzīvniekam resnajā zarnā. Vairums no zarnās esošā *E. coli* ir komensiāli, t.i., tās uzturas zarnās, bet nav kaitīgas saimniekorganismam. Taču neliela daļa no *E. coli* celmiem ir patogēni, tie tiek klasificēti patotipos, balstoties uz virulences faktoru klātbūtni un darbības mehānismu, ar kuru tie izraisa slimību (Kaper et al., 2004). Cūkām vissvarīgākie patotipi ir enterotoksogēnais *E. coli* (ETEC), enteropatogēnais *E. coli* (EPEC), Šiga toksīnu producējošais *E. coli* (STEC) un ārpuszarnu patogēnais *E. coli* (ExPEC). Turklāt, EPEC un ExPEC tiek pārnēsāti kā daļa no normālās zarnu mikrobiotas un tos var uzskatīt par oportūnistiskiem patogēniem (Gyles & Fairbrother, 2010).

E. coli patogenitāte tiek saistīta ar virulences gēniem, kuri ir kodēti transpozonos, plazmīdās, bakteriofāgos un hromosomu posmos, ko sauc arī par patogenitātes salām (PAI) (Kaper et al., 2004). Patotipiem – ETEC, EPEC un STEC ir raksturīga noteiktu virulences faktoru kodējošo gēnu klātbūtne, savukārt ExPEC raksturojas ar lielu kodējošo gēnu daudzveidību, kas atšķiras starp *E. coli* celmiem (Gyles & Fairbrother, 2010). Virulences gēni var tikt pārnesti starp *E. coli* celmiem horizontālās gēnu pārnēsas laikā (C. Tan et al., 2012).

ETEC celmi izraisa kolisepticēmiju visbiežāk jaundzimušajiem (1-5 dienu veciem) (Hartadi et al., 2020) vai arī nesen (3-5 dienas) atšķirtiem sivēniem (Gyles & Fairbrother, 2010). Šo *E. coli* celmu patogenitāti nosaka adhezīnu klātbūtne un spēja ražot enterotoksīnus, kuru regulējošie gēni galvenokārt ir lokalizēti plazmīdās. Adhezīni nodrošina piesaisti specifiskiem zarnu epitēlija receptoriem un sekmē kolonizāciju. Biežāk novērotie ETEC skropstiņu adhezīni jaundzimušajiem sivēniem ir F4 (*faeG*), bet pēcātšķiršanas periodā – F18 (*fedA*); taču sivēniem var būt aktuāli arī citi skropstiņu adhezīni: F5 (*fanC*), F6 (*fasC*), F41 (*fim41A*) (Hartadi et al., 2020) un neskropstiņu adhezīni, saukti AIDA (*aidA*) (Fairbrother et al., 2005). Adhezīna F18 receptoru jaundzimušajiem sivēniem nav, taču enterocītos tie tiek ekspresēti apmēram četrus nedēļus vecumā (Imberechts et al., 1997), kas izskaidro ETEC spēju izraisīt sivēniem diareju atšķiršanas un pēcātšķiršanas periodā. Sivēniem izolētie ETEC spēj ražot gan termostabilos enterotoksīnus – STaP, STb vai enteroagregatīvo *E. coli* karstumizturīgo enterotoksīnu 1 (EAST1), gan arī termolabilo toksīnu – LT1 (W. Zhang et al., 2007). Enterotoksīni izraisa zarnu epitēlija šūnās dažādas elektrolītu līdzsvara izmaiņas, kā rezultātā attīstās diareja, taču tie neizraisa morfoloģiskas izmaiņas zarnu gļotādā vai patoloģiskus bojājumus (Read et al., 2014).

Jaundzimušie sivēni inficējas ar ETEC perorāli, galvenokārt no sivēnmātes piena dziedzeriem un vides, kur tas var saglabāties pat līdz 6 mēnešiem (van Beers-Schreurs et al., 1992). ETEC strauji vairojas un kolonizē tievās zarnas no tukšās zarnas (*jejunum*) vidusdaļas līdz gūžas zarnai (*ileum*). Ar skropstiņu palīdzību *E. coli* piesaistās pie enterocītu specifiskajiem receptoriem un izdala enterotoksīnus. Tie stimulē ūdens un elektrolītu hipersekreciju zarnu lūmenā un samazina absorbciju. Sivēniem izraisa ūdeņainu diareju, dehidratāciju, metabolisko acidozi, kas var rezultēties ar letālu iznākumu. Dažkārt sivēniem infekcija progresē ļoti strauji (īpaši, ja ierosinātājs ir F4 celms), nāve iestājas pirms diarejas attīstības, LPS A daļas izraisīta šoka dēļ, kas lielā daudzumā uzkrāties kolonizācijas laikā. Pēcātšķiršanas diareja ir būtisks atšķirto sivēnu nāves cēlonis. Inficētajiem sivēniem raksturīgas iedzeltenas, pelēkas šķidrās konsistences fekālijas, sivēni novājē un mirstība sasniedz 25% (Gyles & Fairbrother, 2010).

Faktori, kas veicina inficēšanos ir – neatbilstoši higiēnas apstākļi, neatbilstoša dezinfekcija, nepārtraukta ražošanas plūsmas sistēma, vides temperatūra zem 25°C, pārmērīga gaisa plūsma. Minētie faktori sekmē patogēnā *E. coli* sastopamību vidē, samazinātu gremošanas trakta peristaltiku un antivielu uzsūkšanos caur zarnām. Turklāt jaundzimušo sivēnu kuņģa un divpadsmit pirkstu zarnas pH ir augstāks, gremošanas fermenti tiek ražoti mazākā apmērā, kas sekmē patogēnā *E. coli* savairošanos. *E. coli* proliferāciju var sekmēt diēta, kas samazina bārkstīņu augstumu un palielina kriptu dziļumu (Gyles & Fairbrother, 2010).

EPEC celmi pieder pie piestiprināšanās un nolīdzināšanas (*attaching and effacing-AE*) *E. coli* (AEEC) grupas, to radīto bojājumu rakstura dēļ zarnu gļotādā. EPEC virulences faktori ir kodēti patogenitātes salā, kas pazīstama kā “enterocītu nolīdzināšanas lokuss” (EEL). Šī patogenitātes sala kodē vairākus EPEC virulences faktoru gēnus, tostarp ārējās membrānas proteīnu intimīnu (*eaeA*), tā receptoru, kas pazīstams kā translokētais intimīna receptors (*Tir*) un III tipa sekrēcijas sistēmu, kas nodrošina efektoru proteīnu sekrēciju. Veselas cūkas ir AEEC rezervuārs, turklāt cūkām novēro t.s. atipiskos EPEC (aEPEC), kuri izraisa raksturīgos AE histopatoloģiskos bojājumus, taču tiem nav tipisko sākotnējā saišķa veidojošo skropstīņu (*bundle-forming*) *bfpA* un šiga toksīna *sxt* gēnu (Krause et al., 2005). aEPEC, kas raksturīgi cūkām, sauc arī par cūku EPEC jeb PEPEC (Gyles & Fairbrother, 2010).

PEPEC izraisa sivēniem pēcatšķiršanas diareju (Gyles & Fairbrother, 2010), taču kādā pētījumā Spānijā konstatēja, ka sivēniem PEPEC pēcatšķiršanas diarejas izraisītāji bija tikai 21.7% gadījumu, taču 67% gadījumos tie tomēr bija ETEC grupas pārstāvji. Savukārt zīdējsivēniem 60.3% gadījumos diarejas ierosinātāji bija PEPEC un 38.8% ETEC (García-Meniño et al., 2018). PEPEC patoģenēze cūkām joprojām nav skaidra (Malik et al., 2017), tomēr līdzība ar cilvēka EPEC zarnu kolonizēšanas modeļos, kā arī radīto bojājumu un gēna *eae* klātbūtne, varētu norādīt uz līdzīgu patoģenēzes mehānismu (Gyles & Fairbrother, 2010).

Pēc kolonizācijas tievo zarnu beigu daļā un resnajā zarnā, sākotnējo PEPEC piestiprināšanos zarnu epitēlijšūnu mikrobārkstīnām, visticamāk sekmē *efa1*, *lpfA* un *tsh* gēni (Malik et al., 2017). Sekojoši vāji adhezētās baktērijas sekretē proteīnus, kas ir kā signāli epitēlija šūnai. Tie palielina intracelulārā kalcija līmeni, aktivizē kināzes un veicina dažu epitēlija šūnas proteīnu fosforilēšanos. Iepriekšminētās izmaiņas sekmē *Tir* receptora saistīšanos. *E. coli* ārējās membrānas proteīns intimīns atpazīst *Tir* receptoru, kā rezultātā notiek cieša adhēzija (Kaper et al., 2004). Sekojoši attīstās citoskeleta izmaiņas epitēlija šūnā – notiek polarizēta aktīna uzkrāšanās tieši zem adherētās baktērijas, kas sekmē “pjedestāla” izveidi un baktēriju piesaistes tuvumā izzūd zarnu epitēlija mikrobārkstīņas. Iepriekš aprakstītā aktivitāte izraisa arī neitrofīlo leukocītu pieplūdumu baktēriju adhēzijas vietā. Diareju sivēniem visdrīzāk izraisa malabsorbcija, kas rodas absorbējošu mikrobārkstīņu zuduma dēļ AE bojājuma vietā. Straujas diarejas attīstību sekmē pārējie baktērijas ražotie efektorie proteīni, kas ietekmē hlorīdu jonu sekrēciju, samazina enterocītu piesaisti bazālajai membrānai un sekmē lokalizētu iekaisumu bojājuma vietā (Gyles & Fairbrother, 2010).

Sivēniem predisponējošie faktori ir barības maiņa un diēta, kas satur sojas pupas un zirņus, kā arī cūku reproduktīvi respiratorā sindroma (PRRS) vīrusa klātbūtne. Arī sivēnu imūnsistēmas stāvoklim ir būtiska loma AE bojājumu attīstībā (W. Zhang et al., 2007).

STEC celmi ir hemolītiski un producē šiga toksīnu. No STEC, sivēniem aktuāli ir tūskas slimību (ED) izraisošie celmi, kas ražo toksīnu Stx2e un tiek apzīmēti kā EDEC.

Sivēni EDEC uzņem perorāli no kontaminētās vides, ko piesārņo sivēnmāte vai inficētas cūkas, taču tas sastopams arī veselu cūku fekālijās. No sivēniem ar pēcatšķiršanas diareju nereti izolē *E. coli*, kas vienlaicīgi satur gan EDEC gēnu Sxt2e, gan ETEC raksturīgos gēnus – STb un LTI (Baldo et al., 2020). EDEC adhēziju zarnu bārkstīnām nodrošina plazmīdā kodētu F18ab, F18ac, retāk F4 un F6 skropstīņu gēni (Baldo et al., 2020). Jāuzsver, ka F18 receptoru nav jaundzimušiem sivēniem, tāpēc tūskas slimība rodas pēc atšķiršanas, kad zarnu bārkstīņas sāk ekspresēt šo receptoru (Imberechts et al., 1997). Ja cūkām nav F18 receptoru, tās ir rezistentas pret tūskas slimību. Zarnu kolonizāciju sekmē virulences faktors – *alfa* hemolizīns. Pie enterocītiem adherētās *E. coli* ražo Stx2e toksīnu. Absorbciju sekmē Gb4 receptori, kas

lokalizējas uz tievo zarnu kriptās esošajiem enterocītiem. Dažkārt EDEC celmi spēj šķērsot zarnas un nokļūt apzarņa limfmezglos un tur ražot Stx2e. Skarto cūku zarnu epitēlijā nenovēro izmaiņas vai arī tās ir minimālas. Neskarts toksīns šķērso zarnu epitēliju un saistās ar eritrocītiem, kas sekmē tā izplatīšanos dažādos mērķa audos. Mērķa audos toksīns bojā asinsvadu epitēlija un miocītu šūnas, attīstās nekroze. Toksīnam ir līdzīga aktivitāte kā Šiga toksīnam (citotoksīns), ko ražo *Shigella* sugas baktērijas – tas mijiedarbojas ar ribosomu 60 S subvienību un inhibē proteīnu sintēzi saimniekšūnās, kā rezultātā šūnas iet bojā (Gyles & Fairbrother, 2010).

Tūska slimība var būt sporādiska, var skart daļu vai pat visu metienu. Skartajiem sivēniem attīstās plakstiņu, pieres tūska, koordinācijas traucējumi, elpošanas traucējumi, vai arī biežāk – strauja nāve, bez klīniskajām pazīmēm. Ir vairāki veicinoši faktori, kas saistīti ar vidi un sivēniem. Ap atšķiršanas laiku notiek būtiskas izmaiņas sivēnu zarnu epitēlija šūnās, kas sekmē malabsorbciju. Diēta ar augstu proteīna saturu sekmē ātru EDEC savairošanos zarnās. Jūtīgākie metienā parasti ir straujāk augošie sivēni, kas uzņem vairāk barības. Sivēnu transportēšana, metienu apvienošana, stress predisponē EDEC infekciju (Gyles & Fairbrother, 2010).

ExPEC celmi tiek uzskatīti par oportūnistiskajiem patogēniem, jo tie atrodas zarnu mikrobiotas sastāvā, bet var izraisīt smagas infekcijas ārpus gremošanas trakta – septicēmiju, mastītu, urīntrakta infekcijas, mastīta-metrīta-agalaktijas sindromu (MMA), meningītu, pneimoniju, artrītus. ExPEC raksturīga liela virulences gēnu dažādība, kas dažādos *E. coli* celmos var ievērojami atšķirties (C. Tan et al., 2012).

Virulences faktori veicina saimniekorganisma kolonizāciju un invāziju, kā arī palīdz izvairīties no organisma aizsargsistēmas mehānismiem. Raksturīgākie virulences faktori ir adhezīni (I tipa un P skropstiņu), dzelzs ieguves un izmantošanas sistēmas (aerobaktīna, salmohelīna sideroforu), protektanti (baktēriju ārējās membrānas strukturālie komponenti), toksīni (hemolizīns, citotoksiskais nekrozes faktors) un biomembrānu veidojošais faktors (43 anigēns) (Sarowska et al., 2019). Biežāk virulences faktoru kodētie gēni sivēniem un sivēnmātēm ir *fimH*, *hraA* (adhezīns), *ibe* (invāzijas), *iutA*, *fyuA*, *iroN* (dzelzs ieguves), *traT* (*kpsMTIII*) (kapsulas), *vat*, *cnf1* (toksīns) un *agn43* (biomembrānas veidojošs) (Bok et al., 2020; Y. Zhu et al., 2017).

ExPEC celmi no apkārtējās vides nokļūst cūku zarnu traktā un, pateicoties skropstiņu adhezīniem, kolonizē tās, kļūstot par daļu no zarnu normālās mikrobiotas. Kad organisms (bieži jaundzimušie sivēni, sivēnmātes) ir novājināts (vīrusa infekcijas, mikotoksīnu uzņemšana, kolostrālo antivielu trūkums jaundzimušajiem), zarnās kolonizētie ExPEC spēj šķērsot zarnu epitēlija barjeru un izraisīt dažādas infekcijas (Gyles & Fairbrother, 2010).

Septicēmiskais *E. coli* (SEPEC) spēj migrēt starp enterocītiem vai pinocitozes ceļā šķērsot zarnu epitēlija šūnas. Sekojoši migrē uz limfmezgliem un nonāk asinsritē. Baktērijas spēj saglabāties un pat vairoties asinīs un citās ārpuszarnas vietās, ko nodrošina aerobaktīna dzelzs ieguves sistēmas klātbūtne. Noturību un vairošanos sekmē arī SEPEC spēja pretoties komplementa un fagocitozes baktericīdajai iedarbībai. Organisma imūnaizsardzības sistēmai izraisot baktēriju bojā eju, tiek atbrīvoti endotoksīni, kas savukārt aktivizē citokīnu reakciju un sekojoši rezultējas ar letālu iznākumu (Gyles & Fairbrother, 2010).

Infekcijai raksturīga akūta, ģeneralizēta gaita, ar šoka pazīmēm, dažkārt diareju novēro slimības beigu stadijā, kam bieži (līdz 100%) seko letāls iznākums 3-8 h laikā. Dažkārt infekcija var lokalizēties, izraisot poliartītu, meningītu, pneimoniju un metrītu (Gyles & Fairbrother, 2010).

1.2. Rezistentā *E. coli* raksturojums

1.2.1. *E. coli* rezistences ģenētiskie aspekti

E. coli rezistence pret antimikrobiālajām vielām var būt **iedzimta** (burtiski *intrinsic*-iekšējā) un iegūta. Iedzimta jeb dabiska rezistence piemīt visiem noteiktas taksonomiskās grupas (ģints, sugas) pārstāvjiem. Rezistenci kontrolē hromosomas un tā ir saistīta ar baktēriju struktūru un fizioloģiju. Piemēram, *E. coli* jutību pret antibiotikām ietekmē sarežģītās ārējās membrānas uzbūve. Ņemot vērā ārējās membrānas hidrofofās īpašības, *E. coli* pēc būtības ir rezistents pret hidrofofajām antibiotikām (Penicilīns G), savukārt makrolīdu grupas antibiotikām raksturīgas pārāk lielas molekulas, lai šķērsotu šūnas sienīgu un nokļūtu līdz mērķim citoplazmā (Boerlin & White, 2013). **Iegūtā** rezistence ir kā atbildes reakcija uz antibiotiku lietošanu. Tā var izpausties kā rezistence pret vienu antibakteriālo līdzekli, pret atsevišķiem līdzekļiem no kādas antimikrobiālo vielu kategorijas vai pat pret visiem līdzekļiem noteiktā kategorijā. Vienlaicīga vairāku nesaistītu ģenētiskās rezistences noteicēju lokalizēšanās uz tā paša mobilā ģenētiskā elementa izskaidro multirezistenci (Boerlin & White, 2013). Par multirezistentu (MDR) baktēriju uzskata, ja tai vienlaicīgi novēro rezistenci pret vismaz vienu antimikrobiālo līdzekli trijās un vairāk pretmikrobo līdzekļu kategorijās (Magiorakos et al., 2012).

Antimikrobiālās rezistences iegūšana. Hromosomālo antimikrobiālo rezistenci baktērijas var iegūt gēnu mutāciju laikā, kas iesaistīti normālos fizioloģiskos procesos un šūnu struktūrās. Lai arī mutācijas notiek salīdzinoši reti, taču stresa apstākļi (patogēniem saskaroties ar saimniekorganisma aizsardzības mehānismiem, antimikrobiālo vielu klātbūtnē) mutāciju biežumu var palielināt. Tā sauktais mutatorais stāvoklis ir atbildīgs par strauju rezistences attīstību *E. coli in vivo* apstākļos, ārstējot ar noteiktu pretmikrobo līdzekli, piemēram, fluorohinoloniem (Komp Lindgren et al., 2003). Nereti mutantiem ir vēl kādas mainītas īpašības, kas samazina to spēju saglabāties ārējā vidē (Kalily et al., 2017). Līdzās hromosomālajai antimikrobiālajai rezistencei pastāv arī ekstrahromosomālā rezistence, ko kodē eksogēnie ģenētiskie faktori un ir galvenais baktēriju, tostarp *E. coli*, rezistences noteicējs. Rezistentie gēni lokalizējas baktēriju mobilajos ģenētiskajos elementos.

Mobilie ģenētiskie elementi (MGE) – ir DNS segmenti, kas kodē rezistentos gēnus un proteīnus, kas mediē DNS gēnu apmaiņu genomos (intracelulāri vai starp baktēriju šūnām). Lielākie MGE ir **plazmīdas**, kas ir cirkulāras divpavedienu DNS molekulas, atrodas ārpus hromosomām, ir pašreplīcējoši ģenētiski elementi, kuri nesatur gēnus, kas ir būtiski baktēriju funkcijām (izdzīvošanas procesā), taču tās piešķir selektīvas priekšrocības saimniekbaktērijai, jo satur rezistentos gēnus. Plazmīdas var būt konjugējošas un nekonjugējošas. Konjugējošas plazmīdas satur gēnus, kas nodrošina to pārvadi (*resistance transfer factor* (*tra* operonu) jeb sekmē konjugāciju, savukārt nekonjugējošas plazmīdas tiek pārnestas ar konjugējošu plazmīdu palīdzību. *Enterobacteraceae* dzimtas baktērijām ir zināmi 26 plazmīdu tipi (Frost et al., 2005).

Transpozoni ir DNS sekvences. Tie satur mehānismu, insercijas sekvences jeb IS (*insertion sequences*), kas nodrošina to integrāciju DNS struktūrā, tādējādi tie spēj “ielēkt” genoma citā vietā un nereti tiek saukti par “lēkājošiem gēniem”. Transpozoni nav pašreplīcējoši, tie replīcējas kopā ar genomu un tie var tikt pārnesti horizontāli starp baktērijām. **Integroni** satur gēnu kasetes un promoteru, kas pārnes rezistentos gēnus uz plazmīdām un transpozoniem (Partridge, 2015).

Baktērijas rezistences gēnus var iegūt horizontālā gēnu pārneses ceļā, izmantojot kādu no trim rekombinācijas mehānismiem – transformāciju, transdukciju un konjugāciju.

Transformācija – sveša DNS fragmenta iekļaušana, aizstājot homologisko gēnu, ko mediē hromosomu kodētie proteīni (Frost et al., 2005). Lai arī dabiskos apstākļos *E. coli* baktērijām šo mehānismu nenovēro, tomēr noteiktos apstākļos (izmantojot subminimālu inhibējošu ampicilīna koncentrāciju) un, vienlaicīgi izmantojot mehāniskos stimulātorus

(berze), tika pierādīti horizontālo plazmīdu pārnēsēji starp *E. coli*, izmantojot transformāciju (Kasagaki et al., 2022).

Transdukcija ir sveša DNS pārnešana no vienas baktērijas uz otru ar bakteriofāga palīdzību. Bakteriofāga ievadītais DNS fragments var rekombinēties hromosomā un var tikt mantots. Pētījumos ir pierādīts, ka antimikrobiālās rezistences gēni ir reti kodēti fāgos, kas iegūti no cilvēku un peļu bakteriālajām ekosistēmām (Enault et al., 2017). Taču kādā pētījumā no notekūdeņiem iegūtajos paraugos specifiskajos *E. coli* bakteriofāgos konstatēja augstu (20%) *bla*_{CTX-M-15} gēna izplatību, kas varētu norādīt uz noteiktu rezistentu gēnu spēju izplatīties starp *E. coli* celmiem transdukcijas ceļā (Roshini et al., 2017).

Konjugācija – konjugējošu plazmīdu vai hromosomā integrētu konjugatīvu elementu (piemēram, konjugatīvu transpozonu) pārnešana starp baktērijām, izmantojot “pārošanās” līdzīgu procesu – sauktu par konjugāciju, kad pēc tieša divu baktēriju kontakta donora baktērija nodod plazmīdu recipient-baktērijai. Tas ir galvenais un visbiežāk novērotais ģenētiskās rekombinācijas mehānisms rezistentu gēnu pārnēsē starp baktērijām (Frost et al., 2005).

1.2.2. Rezistences mehānismu raksturojums

Ir vairāki mehānismi, kas nodrošina *E. coli* rezistenci pret antibiotikām.

Samazināta baktērijas membrānas caurlaidība. *E. coli* pārstāvjiem ir raksturīga Gram negatīvo baktēriju sarežģītā šūnas sienas struktūra – to veido ārējā un iekšējā membrāna, kas norobežo periplazmatisko telpu. Ārējā membrānā ir lokalizēti porīni – proteīnu poras, kas nodrošina hidrofilo molekulu difūziju. Lielākā daļa porīnu, kas iesaistīti antibiotiku (bēta-laktāmu, fluorohinolonu, tetraciklīnu) aktīvajā transportā, pieder pie OmpF un OmpC apakšgrupas.

Ir divi galvenie mehānismi, kas nodrošina porīnu balstītu rezistenci:

1. izmaiņas membrānas profilā, kad novēro porīnu zudumu, būtisku to skaita samazināšanos vai lielu porīnu kanālu aizvietošanu ar maza izmēra porīnu kanāliem;
2. izmainītas porīnu funkcijas mutāciju dēļ (Delcour, 2009).

Efluksa jeb sūkņa mehānisms. Aktīvā izplūde (eflukss) katalizē antibakteriālo vielu aktīvo atpakaļpārnesi periplazmatiskajā telpā vai arī tieši ārējā vidē. Izplūdes sūkņi ir hromosomu kodēti ģenētiskie elementi, kas nodrošina gan iedzimtu, gan iegūtu rezistenci pret toksiskiem savienojumiem, tostarp antibiotikām. Tie var būt specifiski vienam substrātam vai arī nodrošināt dažādu antimikrobiālo līdzekļu ekstrūzijas. Turklāt tas galvenokārt darbojas kā globāls regulators, iesaistoties baktēriju fizioloģijas procesos, nevis tikai kā reakcija uz antibiotiku klātbūtni (Alvarez-Ortega et al., 2013).

E. coli raksturīgs AcrAB-TolC komplekss, kas pieder pie RND (*Resistance-Nodulation-Division*) dzimtas izplūdes sistēmas transportētājiem. Izplūdes sūkņa sistēma sastāv no trīspusēja kompleksa – ārējās membrānas TolC proteīna, iekšējās membrānas AcrB proteīna un periplazmā lokalizētas membrānu saplūšanas jeb adaptera proteīna AcrA (Blair & Piddock, 2009).

Graujošu un modificējošu enzīmu izdale. Antimikrobiālā līdzekļa modifikācija ar baktēriju enzīmiem notiek, kad tas ir nonācis baktērijas šūnā (hloramfenikols) vai periplazmatiskajā telpā (bēta-laktāma antibiotikas), pirms antimikrobiālā viela baktērijā ir sasniegusi darbības mērķi. Citoplazmā baktērijas producētās transferāzes inaktivē aminoglikozīdu un hloramfenikola antibiotikas, modificējot tās ķīmiski – pievienojot adenilgrupas, fosforilgrupas vai acetilgrupas. Modificētām antibiotikām ir traucēta saistīšanās ar mērķi baktēriju šūnā un tās ir neaktīvas (Shaikh et al., 2015). *Enterobacteriaceae*, t. sk., *E. coli*, rezistenci pret bēta-laktāma antibiotikām (penicilīniem, cefalosporīniem, karbapenēmiem) nodrošina baktēriju periplazmatiskajā telpā ražotās bēta-laktamāzes (kodē *bla* gēni), kas hidrolizē bēta laktāma gredzenu, izraisot antibiotiku inaktivāciju (Partridge, 2015).

Mērķa modifikācija. Baktērija spēj mainīt antimikrobiālās vielas mērķi, proti, receptoru, pie kuras tas piestiprinās. *E. coli* rezistenci pret fluorohinoloniem galvenokārt izraisa mutācijas DNS girāzē (topoizomerāzē II). Hinolonu rezistentajām baktērijām mutāciju galvenās vietas lokalizējas noteiktos reģionos, ko sauc par hinolonu rezistences noteicošajiem reģioniem (*quinolone resistance-determining region (QRDR)*) *gyrA* un *parC*. *E. coli* gadījumā lielākā daļa mutāciju rodas *gyrA* reģionā pie aminoskābēm serīna83 un aspartāma87 vai *parC* reģionā pie aminoskābēm serīna80 un glutamīnskābes84 (Karczmarczyk et al., 2011).

Baktērijas spēja mainīt bioķīmiskās reakcijas. Ķīmisko vielu – sulfonamīdu un trimetoprima – darbības pamatā ir folskābes sintēzes inhibēšana baktēriju šūnā, kā rezultātā ir traucēta to augšana un vairošanās. Plazmīdās un integronos kodētie gēni – *sul1*, *sul2*, un *sul3*, kas bieži ir kodēti kopā ar *dfrA* (nodrošina rezistenci pret trimetoprimu) nodrošina pret sulfonamīdiem nejutīga enzīma (dihidropteroāta) ražošanu. Savukārt *dfrA* kodē dihidrofolāta reduktāzes mutantus, kas ir mazāk jutīgi pret trimetoprima inhibīciju (Prescott, 2013b).

1.2.3. Paplašināta spektra bēta-laktamāzes, to fenotipiskais raksturojums

Bēta-laktamāzes ir enzīmu grupa, kas hidrolizē bēta-laktāma grupas antibiotikas, atrodas baktēriju šūnas sienas periplazmātiskajā telpā, bet, baktērijai lizējoties – tās var nonākt ekstracelulāri (Prescott, 2013a). Bēta-laktamāzes ir dabiski sastopamas dažādās baktērijās, bet selekciju un izplatību ir sekmējusi bēta-laktāmu antibiotiku plaša un, bieži vien nepareiza, lietošana, kā arī bēta-laktamāžu kodējošo gēnu lokalizēšanās mobilajos ģenētiskajos elementos – plazmīdās. Parādoties pirmās un otrās paaudzes cefalosporīniem, radās plaša spektra bēta-laktamāzes enzīmi TEM-1 un SHV-1, bet, parādoties antibiotikām oksiminocefalosporīniem (ceftazidīmam un cefotaksīmam), tika sekmēta paplašināta spektra enzīmu (serīna bēta-laktamāžu) attīstība (Bush & Jacoby, 2010).

Paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBLs) ir heterogēnu enzīmu grupa, kas hidrolizē penicilīnus, cefalosporīnus, t.sk. oksimino- β -laktāma savienojumus (cefuroksīmu, trešās un ceturtais paaudzes cefalosporīnus (cefotaksīmu, ceftazidīmu un cefepīmu) un monobaktānu (aztreonāmu), bet ne cefamicīnus (cefotetanu, cefoksitīnu) un karbapenēmus (imipenēmu, ertapenēmu, meropenēmu, doripenēmu), turklāt tos inhibē bēta-laktamāzes inhibitori (klavulānskābe, sulbaktāms un tazobaktāms) un avibaktāms (EUCAST, 2017b). Šie enzīmi galvenokārt atrodami *E. coli* un *Klebsiella pneumoniae*, lai gan sastopami arī citām *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām.

ESBL producējoši *E. coli* fenotipi savstarpēji būtiski atšķiras, jo ESBL kodējošie gēni tiek ekspresēti dažādos līmeņos, turklāt būtiski atšķiras to bioķīmiskās īpašības, piemēram, aktivitātē pret specifiskām bēta-laktāmu antibiotikām (cefotaksīmu, ceftazidīmu, aztreonāmu). Intensīva bēta-laktamāžu evolūcija ir rezultējies ar lielu strukturālu daudzveidību, kas ietver vairākas laktamāžu ģimenes, apakšģimenes un variantus. Pat nelielas strukturālas izmaiņas var izraisīt lielas bioķīmisko īpašību atšķirības, mainot rezistences fenotipu (Gniadkowski, 2008). Turklāt plašu rezistences fenotipu dažādību ESBL pozitīvo izolātu vidū nodrošina arī citu rezistences mehānismu (cita bēta-laktamāze, aktīvā izplūde jeb efluksa un samazinātas caurlaidības) līdzāspastāvēšana (EUCAST, 2017b).

1.2.4. Paplašināta spektra bēta-laktamāžu (ESBL) genotipiskais raksturojums un klasifikācija

E. coli spēju producēt paplašināta spektra bēta-laktamāzes (ESBL) nosaka gēna *bla* klātbūtne, kas ļoti bieži kodēts mobilajos ģenētiskajos elementos (MGEs), piemēram, plazmīdās, transpozonos, inserkcijas sekvencēs, integronos, bakteriofāgos. MGEs var pārvietoties paši vai to gēni var tikt pārnesti intracelulāri vai starp baktērijām konjugācijas un transformācijas ceļā, kā arī ar bakteriofāgiem transdukcijas laikā (Partridge et al., 2018). Turklāt

gēnu *bla* lokalizēšanās MGEs, īpaši plazmīdās, ir sekmējusi rezistences strauju izplatību ne tikai vienas sugas (*E. coli*) populācijā, bet pat ģinšu un dzimtas (*Enterobacteriaceae*) līmenī (Carvalho et al., 2021).

Īpaša nozīme ESBL producējošu *E. coli* globālajai izplatībai ir bijusi “augsta riska” kloniem, kas ir kā rezistentu gēnu rezervuāri. Kā viens no raksturīgākajiem pārstāvjiem ir virulentais ESBL producējošais *E. coli* klons ST131, kas satur *bla*_{CTX-M-15}. Bieži MGEs satur arī citus rezistences gēnus, kā rezultātā piešķir baktērijai MDR fenotipu (Partridge et al., 2018).

Bēta-laktamāzes var klasificēt, balstoties uz molekulāro raksturojumu – Amblera klasifikācija, kad tiek ņemta vērā nukleotīdu, aminoskābju secība vai arī, balstoties uz bēta-laktamāžu funkcionālo raksturojumu – Buša-Jākoba-Madeiras klasifikāciju, kad ņem vērā enzīma spēju hidrolizēt noteikta veida substrātu (piem., ceftazidīma, cefotaksīma) un bēta-laktamāzes enzīma inhibīcijas profilu, proti, bēta-laktamāzes enzīma inhibēšanas iespējas ar klavulānskābi (Bush & Jacoby, 2010).

Lai gan ESBL ir kopīgas bioķīmiskās īpašības (hidrolizē paplašinātā spektra β -laktāmus un vienlaicīgi enzīms ir pakļauts klavulānskābes inhibīcijai), tomēr gēni, kas kodē šos enzīmus, atšķiras un tos var sagrupēt vairākās dzimtās. TEM un SHV gēnu dzimtas ir ļoti saistītas, varianti atšķiras tikai ar dažu aminoskābju aizvietošanu, savukārt CTX-M dzimta ir daudz ģenētiski daudzveidīgāka, turklāt,niecīgas molekulāra rakstura atšķirības var izraisīt ļoti būtiskas funkcionālas izmaiņas, t.i., mainīt fenotipu.

Saskaņā ar Amblera klasifikāciju, paplašinātā spektra bēta-laktamāzes pieder A un retāk D klasei. A klases bēta-laktamāzēm ir aminoskābe serīns to aktīvajā daļā, tādēļ tās tiek sauktas par serīna β -laktamāzēm (Bush & Jacoby, 2010). Galvenie A klases ESBL varianti ir SHV, TEM un CTX-M β -laktamāzes, ievērojami retāk novēro GES, PER un VEB, taču D klasē klasificēti OXA varianti (ECDC, 2014).

TEM tipa ESBLs ir iegūtas no pirmatnējā plazmīdu medītētā TEM-1 varianta, notiekot vienai vai vairākām punktveida mutācijām (aizvietojot aminoskābes) *bla*_{TEM-1} (Bush & Jacoby, 2010). Pirmais TEM tipa variants, kam bija ESBL fenotips, bija TEM-3 un līdz šim zināmi ir 243 varianti (Castanheira et al., 2021), tiesa, ne visi ir ESBL fenotipi. Aminoskābju aizvietošana TEM kodējošā gēnā var notikt tikai noteiktās pozīcijās un to raksturošanai tiek izmantota Amblera numerācija. Domājams, ka Gly238Ser un Glu240Lys substitūcijas visbiežāk ietekmē ESBL fenotipa veidošanu (Bradford, 2001). Saskaņā ar Buša-Jākoba-Madeiras klasifikāciju, paplašinātā spektra TEM pieder pie 2be funkcionālās apakšgrupas. Tie spēj hidrolizēt penicilīnus (pirmās paaudzes cefalosporīnus), oksimino- β -laktāmus (piem., cefotaksīmu, ceftazidīmu, aztreonāmu) (Bush & Jacoby, 2010).

Dažiem ESBL TEM tipiem (TEM-3, TEM-10) piemīt reģionāls raksturs, savukārt citiem (TEM-26) piemīt globāls raksturs. Aizvien pieaug tendence, ka TEM tipi kļūst retāk sastopami, pateicoties CTX-M globālajai izplatībai (Castanheira et al., 2021).

SHV tipa ESBLs vēsturiski raksturīga hromosomāli kodētu enzīmu izcelsme. Pirmais SHV tipa ESBL variants bija SHV-2, kas no SHV-1 atšķīrās ar vienu aminoskābes aizvietošanu Gly238Ser. Līdzīgi kā TEM tipam, arī lielākajai daļai SHV tipu ESBL mutācijas ir Amblera 238 un 240 pozīcijā. Šobrīd atklāti 228 SHV varianti (Castanheira et al., 2021), taču ne visi ir ESBL, turklāt, ne visi ir funkcionāli raksturoti. Saskaņā ar Buša-Jākoba-Madeiras klasifikāciju paplašinātā spektra SHV pieder pie 2be funkcionālās apakšgrupas (Bush & Jacoby, 2010). Pasaulē izplatītākie ir SHV-5 un SHV-12, taču līdzīgi kā ar TEM, to ietekme starp klīniski svarīgajiem ierosinātajiem tomēr samazinās (Castanheira et al., 2021).

CTX-M tipa enzīmi ir atzīti kā izplatītākie kopš 2000. gadu sākuma. Saskaņā ar sekvenču homoloģijām, CTX-M ir sagrupēts piecās grupās: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 CTX-M-25 (Bonnet, 2004). No CTX-M-1 grupas biežāk konstatētie kodējošie gēni ir *bla*_{CTX-M1} *bla*_{CTX-M3} *bla*_{CTX-M15}. CTX-M-9 grupā biežāk konstatē *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M14} un *bla*_{CTX-M27} gēnus. Savukārt grupās CTX-M-2, CTX-M-8 un CTX-M-25 visizplatītākie ir vadošo grupu pārstāvju kodējošie gēni (Castanheira et al., 2021).

Agrīnie CTX-M varianti efektīvi hidrolizēja cefotaksīmu un ceftriaksonu, tādēļ arī tika dots nosaukums “cefotaksimāze”, mazāk “ceftazidīms”, taču šobrīd aprakstītie CTX-M varianti ir ar pastiprinātu ceftazidīma hidrolītisko aktivitāti. Ceftazidīmu efektīvāk hidrolizē CTX-M-15 (no CTX-M-1 grupas) un CTX-M-27 (no CTX-M9 grupas). CTX-M-15 ir atvasināts no CTX-M-3 un raksturojas ar vienu aminoskābes maiņu 240 pozīcijā (Asp uz Gly). Šobrīd ir konstatēti 231 CTX-M varianti, visi ESBL (Castanheira et al., 2021). Saskaņā ar Buša-Jākoba-Madeiras klasifikāciju CTX-M pieder pie 2be funkcionālās apakšgrupas (Bush & Jacoby, 2010).

OXA tipa ESBL pieder pie Amblera D klases un hidrolizē papildus oksacilīnu. Šim tipam raksturīgs mainīgums aminoskābju sekvencēs un substrātu hidrolīzes profilos. Saskaņā ar Buša-Jākoba-Madeiras klasifikāciju OXA enzīmi iedalīti 2d funkcionālajā apakšgrupā, bet tie, kas pieder ESBL, ir iedalīti 2de funkcionālajā apakšgrupā (Bush & Jacoby, 2010). Izplatītākie ESBL OXA tipi ir atvasināti no OXA-10 un OXA-2. Lai gan OXA-1 netiek uzskatīts par ESBL, tomēr tam piemīt spēja hidrolizēt cefepimu, turklāt OXA-1, apvienojumā ar porīnu zudumu, tiek saistīti ar “viltus ESBL” fenotipiem. Taču, tā kā OXA enzīmi ir izturīgi pret bēta-laktamāžu inhibitoru – klavulānskābi, pētnieki to klasificēšanu par ESBL tomēr apstrīd.

Citas ESBL dzimtas. Krietni retāk, taču ESBL novērojami arī GES, PER, VEB. Ir aprakstītas, taču sastopamība ir ļoti ierobežota SFO, TLA un BES dzimtām (Castanheira et al., 2021).

1.2.5. Rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* epidemioloģija

PVO ir brīdinājusi, ka antibiotiku rezistence ir augošs globālais drauds sabiedrības veselībai, tā rada lielas bažas valstīm un daudzām nozarēm. Baktēriju rezistence ir kļuvusi tik izplatīta, ka tiek apdraudēti mūsdienu medicīnas sasniegumi, turklāt pasaule virzās uz tā saukto “post antibiotiku ēru”, kad cilvēki mirst no vienkāršām infekcijas slimībām un pat nelieliem ievainojumiem, kuras vēl nesenā pagātnē bija iespējams izārstēt (WHO, 2014). Antibiotiku rezistences draudu nopietnība ir mudinājusi daudzas valstis uzsākt rezistences uzraudzības programmas, lai novērtētu problēmas apmērus, sekotu tās attīstībai laika gaitā un novērtētu kontroles pasākumu efektivitāti, piemēram, ASV nacionālā antimikrobiālās rezistences monitoringa sistēma (NARMS), Kanādas integrētā programma antimikrobiālās rezistences novērošanai (CIPARS), Dānijas integrētā antimikrobiālās rezistences monitoringa un pētījumu programma (DANMAP). Šo programmu ietvarā tiek monitorēta arī rezistence baktērijām, kas tiek uzskatītas par vispārējās rezistences situācijas indikatoriem – *E. coli*, *Enterococcus* spp. Apjomīgu ziņojumu par antimikrobiālo rezistenci Eiropā periodiski sniedz Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde (EFSA) un Eiropas slimību profilakses un kontroles centrs (ECDC) par rezistences līmeni zoonotiskajām un indikatorbaktērijām, kas izolētas no cilvēkiem, dzīvniekiem un pārtikas. Pārskatā ir ietverti dati arī par indikatorbaktērijas *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* izplatību nobarojamajām cūkām ES valstīs, Norvēģijā, Šveicē un Islandē. Jāuzsver, ka valsts uzraudzības programmās bieži tiek izmantota līdzīga metodoloģija, kas nodrošina datu salīdzināšanas iespējas.

Rezistentā *E. coli* izplatība. Kanādā no nobarojamajām cūkām izolētajiem *E. coli* visbiežāk novēroja rezistenci pret tetraciklīnu (64.8%), kam sekoja rezistence pret streptomicīnu (38.2%), ampicilīnu (29%) un trimetoprimu-sulfamethoksazolu (12%) (CIPARS, 2022). 2012. gadā ASV iegūstot nobarojamo cūku fekāliju paraugus no 13 ASV štatiem, izolējot un nosakot rezistenci 1433 *E. coli* izolātiem, tika konstatēta ārkārtīgi augsta rezistences līmenis pret tetraciklīnu (91.2%), augsta rezistences līmenis pret tādām antibiotikām kā sulfisoksazolu (33.6%), streptomicīnu (29.2%), ampicilīnu (21.5%), bet vidējs pret hloramfenikolu (11.2%) (USDA-APHIS, 2016). Vidēji Eiropas valstīs, indikatorbaktērijai *E. coli*, kas izolēta no cūkām, novēroja ļoti augstu un augstu rezistences līmeni pret tetraciklīnu

(52.1%), sulfametoksazolu (42.4%), ampicilīnu (38.5%) un trimetoprimu (32.2%). Tajā pat laikā starp ES valstīm tika novērotas būtiskas rezistences izplatības atšķirības, piemēram, rezistence pret tetraciklīnu visaugstākā tika konstatēta Portugālē (89.4%), bet zemākā – Zviedrijā (9%), rezistence pret sulfametoksazolu visaugstākā – Kiprā (82.5%), viszemākā – Somijā (12%), taču pret ampicilīnu visaugstākā – Spānijā (77.1%), bet zemākā – Somijā (8.6%). No cūkām izolētajiem *E. coli* rezistence pret tādām kritiski svarīgām antibiotikām kā fluorohinoloniem (ciprofloksacīnu) kopumā ES valstīs tika vērtēta kā zema (10.6%), bet pret trešās paaudzes antibiotikām (cefotaksīmu un ceftazidīmu) pat ļoti zema – attiecīgi 1.4% un 1.3%, taču rezistences izplatība būtiski atšķiras starp valstīm – visaugstākā rezistence pret ciprofloksacīnu tika konstatēta Spānijā (44.7%), Rumānijā (34.7%) un Itālijā (22.4%), bet pret trešās paaudzes cefalosporīniem – Beļģijā (7.4%) (EFSA & ECDC, 2020). Eiropā rezistences izplatībai novērojamas reģionālas tendences – zemi rezistences izplatības rādītāji novērojami Eiropas ziemeļu daļā – Skandināvijas valstīs, bet augsti – Eiropas dienvidu daļā. (EFSA & ECDC, 2020). Arī Latvija ir ziņojusi indikatorbaktērijas *E. coli* (n=149) rezistences datus, kas iegūti no nobarojamajām cūkām. Rezistence pret tetraciklīnu, ampicilīnu, sulfametoksazolu, trimetoprimu, ciprofloksacīnu un cefotaksīmu bija attiecīgi 31.5%, 26.8%, 22.1%, 13.4%, 10.6% un 0.7% (EFSA & ECDC, 2020).

Kā liecina zinātnieku publicētie dati, ļoti augsta rezistentā *E. coli* izplatība cūkām ir novērojama Ķīnā, kur visaugstākais rezistences līmenis bija pret tetraciklīnu (91.0%), tam sekoja pret ampicilīnu (81.4%), florfenikolu (65.4%) ciprofloksacīnu (58.8%) un gentamicīnu (54.3%) (M. Li et al., 2022). Tāpat ārkārtīgi augsta rezistentā *E. coli* izplatība tika konstatēta nobarojamajām cūkām Taizemes vidēji lielās cūku fermās, kur ļoti augsts rezistences līmenis tika novērots pret ampicilīnu (100%), amoksicilīnu (100%), tetraciklīnu (92%), piperacilīnu (83%), amoksicilīnu+klavulānskābi (75%), gentamicīnu (75%), cefaleksīnu (75%), cefovecīnu (75%), ceftiofūru (75%), imipenēmu (75%), hloramfenikolu (75%) un trimetoprimu-sulfametoksazolu (42%) (Dawangpa et al., 2022).

Rezistentā *E. coli* izplatība cūkām atšķiras ne tikai dažādos pasaules reģionos, bet arī kā ietekmējošo faktoru var uzsvērt cūku vecumu. Biežāk rezistentā *E. coli* klātbūtne tiek konstatēta sivēniem, salīdzinot ar nobarojamajām cūkām, ko novēroja arī Akvars ar līdzautoriem, apsekojot 47 noslēgta ražošanas cikla cūku fermas Kanādā. Antibiotiku rezistentā *E. coli* izplatība starp atšķirtiem sivēniem un nobarojamajām cūkām bija attiecīgi sekojoša: pret tetraciklīnu 89.6% un 73.0%, sulfametoksazolu 70.4% un 46.6%, ampicilīnu 44.7% un 25.7%, neomicīnu 12.6% un 7.0%, bet pret hloramfenikolu 15.5% un 6.4% (Akwar et al., 2008). Līdzīgus novērojumus ziņoja Mesa-Verona ar līdzautoriem, salīdzinot rezistentā *E. coli* izplatību starp veselajiem atšķirtajiem sivēniem un nobarojamajām cūkām Vācijā, kur to izplatības attiecība bija sekojoša: pret ampicilīnu 50.8% un 33.2%, trimetoprimu 36.0% un 26.1% un ciprofloksacīnu 4.0% un 0.9% (Mesa-Varona et al., 2021).

Būtiski pieaug rezistentu baktēriju, tostarp *E. coli* izplatība cūkām, ja saimniecībā tiek plaši lietotas antibiotikas. Taizemē tika salīdzināts rezistentā *E. coli* izplatības pieaugums cūkām, atkarībā no antibiotiku iekļaušanas/neiekļaušanas cūku barībā. Tiamulīna un amoksicilīna pievienošana barībai būtiski palielināja rezistenci pret tādām antibiotikām kā cefaleksīnu, ceftiofūru, cefpiromu, cefpodoksīmu, gentamicīnu, tobramicīnu, ka arī pieauga multirezistentā un ESBL producējošā *E. coli* izplatība, īpaši sivēniem un jauncūkām, savukārt saimniecībā, kas nesaņēma antibiotikas pie barības, rezistences izplatība nepieauga ne pret vienu no 18 antibakteriālajiem līdzekļiem (Lugsomya et al., 2018).

ESBL producējošā *E. coli* izplatība. ESBL producējošās baktērijas, tostarp ESBL producējošā *E. coli* izplatība rada īpašus draudus 21.gadsimtā, pateicoties tā straujajai globālajai izplatībai (WHO, 2017) un spējai nodrošināt rezistenci vienlaicīgi pret penicilīniem un jaunākās paaudzes (trešās un ceturtās paaudzes) cefalosporīniem un monobaktāmiem. Pateicoties tam, ka ESBL gēni visbiežāk lokalizējas mobilajos ģenētiskajos elementos un ir inkorporēti starp citiem rezistentajiem gēniem, ESBL producējošajām baktērijām raksturīga strauja globāla izplatība un multirezistence (Carvalho et al., 2021).

Eiropā par ESBL producējošā *E. coli* izplatību nobarojamajām cūkām ir ziņojusi EFSA 2020. gada ziņojumā (par 2017/2018 pārskata gadiem) (EFSA & ECDC, 2020). Vidēji Eiropā (Norvēģija, Islande, Šveice un 28 ES valstis) pret cefotaksīmu un ceftazidīmu rezistentā *E. coli* izplatība nobarojamajām cūkām ir zema, attiecīgi 1.4% un 1.3%. Taču pielietojot specifisku ESBL-*E. coli* monitoringa programmu, kas ļauj konstatēt pat nelielu rezistentu izolātu klātbūtni paraugos, atklāja augstu (34.3%) ESBL producējošā *E. coli* sastopamību Eiropā nobarojamo cūku aklās zarnas satura paraugos. Sastopamība starp valstīm svārstījās no 0% (Islandē) un 0.3% (Somijā) līdz 80.3% (Spānijā). Kopumā Ziemeļeiropas valstīs ESBL producējošā *E. coli* sastopamība ir zemāka nekā citos reģionos (Rietumeiropa, Austrumeiropa un Dienvideiropa). Īpaši zemi rādītāji tika konstatēti Skandināvijas valstīs, kur augstākā sastopamība bija Dānijā – 6.8%. Turpretī Latvijā, izmeklējot 149 paraugus, tika konstatēta augsta (42.3%) ESBL producējošā *E. coli* klātbūtne nobarojamajām cūkām (EFSA & ECDC, 2020). Rietumeiropā, augstākais sastopamības līmenis bija Beļģijā (60.7%), zemākais – Nīderlandē (11%), Austrumeiropas valstīs visaugstākā sastopamība – Ungārijā (56.2%), zemākā – Čehijā (17.6%). Dienvideiropas valstīs īpaši raksturojas ar augstu ESBL producējošā *E. coli* sastopamību, kur Spānijā un Itālijā tika konstatēta attiecīgi 80.3% un 69.2%, savukārt Kiprā – viszemākā (0.8%) (Bergšpica et al., 2020; EFSA & ECDC, 2020).

ESBL producējošā *E. coli* sastopamība atsevišķās Eiropas valstīs ir tikusi monitorēta kopš 2012. gada, piecās no astoņām valstīm ESBL producējošā *E. coli* sastopamība ir dramatiski palielinājusies. Piemēram, 2012. gadā Austrijā pret cefotaksīmu un ceftazidīmu rezistenti *E. coli* nobarojamajām cūkām netika konstatēta, savukārt 2015. gadā sastopamība pieauga līdz 48.2%, bet 2017. gadā – pat līdz 58.8%. Līdzīgus ESBL producējošā *E. coli* sastopamības pieaugumus novēroja Beļģijā, kur rezistence pret cefotaksīmu un ceftazidīmu bija 2.9% un 3.4%, 2015. gadā – 54.7%, bet 2017. gadā – 60.7% (Bergšpica et al., 2020). Jaunākajā pārskata ziņojumā par 2018/2019 gadu, ESBL producējošā *E. coli* sastopamība cūkām gan Beļģijā, gan Austrijā samazinājās attiecīgi līdz 56.9% un 40.2%, taču, salīdzinot ar iepriekšējo periodu, būtiska ESBL producējošā *E. coli* sastopamība pieauga nobarojamajām cūkām Itālijā – no 69.2% līdz 85% (EFSA & ECDC, 2021).

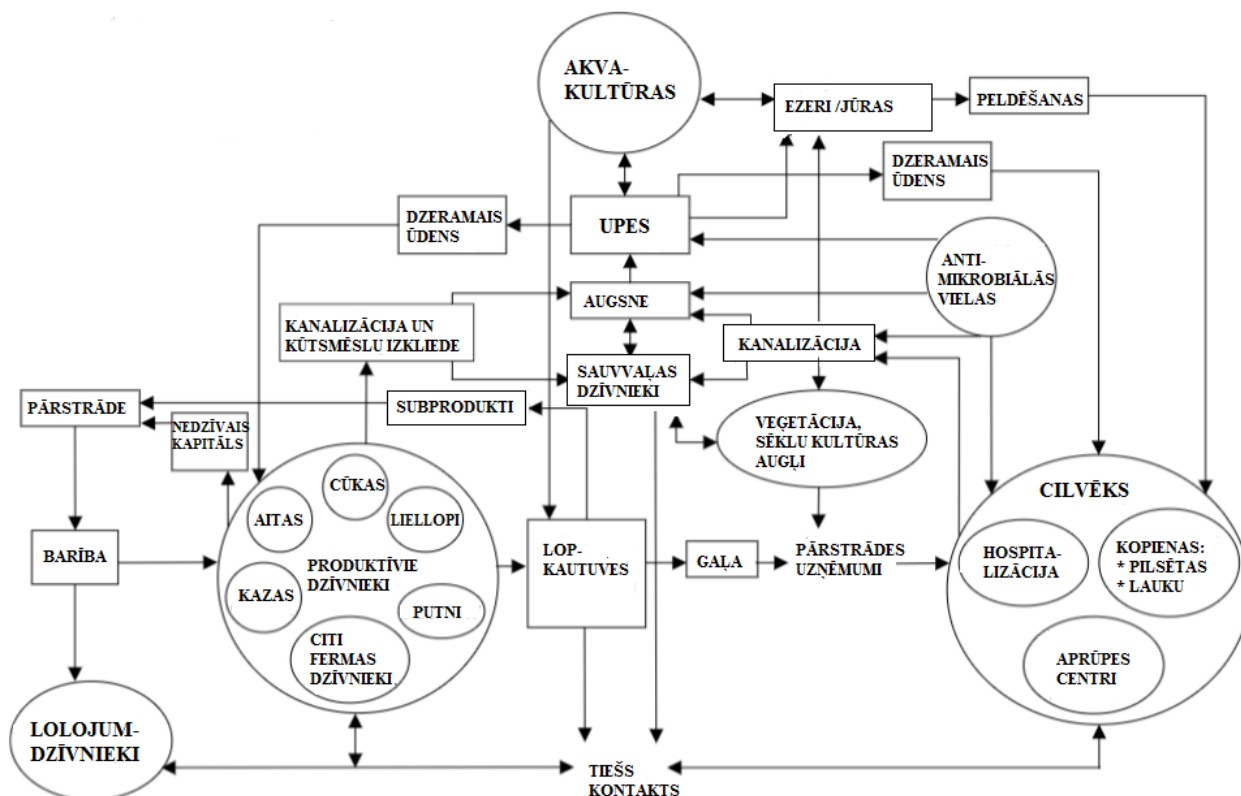
Līdzīgi kā rezistentā *E. coli* izplatība, arī ESBL producējošā *E. coli* izplatība biežāk augstāka ir sīvēniem salīdzinot ar nobarojamajām cūkām. Dienvidkorejā apsekojot 9 fermas, ESBL sastopamība cūkām svārstījās no 17.6-89.7%, turklāt nobarojamajām cūkām tā sastopamība bija būtiski zemāka (48.4%) nekā atšķirtajiem sīvēniem (86.3%) (M. Li et al., 2022).

Satraucošs fakts, ka rezistentajām un īpaši ESBL producējošajām baktērijām izdaloties ar izkārnījumiem, tiek piesārņota vide, tādējādi apdraudot citus dzīvniekus un cilvēkus, un, tā kā cūkas ir produktīvie dzīvnieki, pastāv risks rezistentajām baktērijām nokļūt pārtikas ķēdē (1.1. attēls). Kā ziņots EFSA 2020. gada ziņojumā, izmantojot specifisku ESBL monitoringa programmu, ESBL producējošā *E. coli* sastopamība cūkgaļā ES valstīs 2017/2018 gadā svārstījās no 0% (Somija, Luksemburga, Zviedrija, Apvienotā Karaliste) līdz 11.1% (Malta). Latvijā izmeklējot 149 paraugus, ESBL producējošā *E. coli* klātbūtne tika konstatēta 8.1% gadījumos (EFSA & ECDC, 2020).

Vācijā tika pētīta ESBL producējoša *E. coli* izplatīšanās apkārtējā vidē no 7 cūku fermām. Pētījumā konstatēja, ka lielākā daļa vircas paraugu (82.4%) ir pozitīvi uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, turklāt tā klātbūtne tika konstatēta 64.3% lauka augsnes paraugos, kas mēsloti ar cūku vircu. 9.5% no kontrolētajiem gaisa paraugiem fermā, 25% no mušu paraugiem un 100% suņu fekāliju (kas uzturas fermas teritorijā) tika konstatēta ESBL producējoša *E. coli* klātbūtne. Tāpat ESBL producējošā *E. coli* klātbūtne tika konstatēta 6% gaisa paraugos (50 m attālumā no fermas) un 18.2% zemes virsmas paraugos (500 m attālumā no fermas) (von Salviati et al., 2015).

Apjomīgā pārskata ziņojumā, kur tika salīdzināta ESBL producējoša *E. coli* globālā izplatība (nēsāšana) cilvēku zarnu saturā no 2000.-2020. gadam starp veselības aprūpes un sabiedrības kopienām, tika konstatēts, ka tā izplatība cilvēku zarnu saturā laika periodā ir ar

augošu tendenci – pieaug izplatība gan sabiedrības kopienās, gan veselības aprūpes iestādēs, turklāt veselības aprūpes iestādē izplatība kopumā ir augstāka (21.1%) nekā sabiedrības kopienās (17.6%). Salīdzinot ESBL producējošo *E. coli* globālo izplatību, visaugstākā tā ir Dienvidaustrumāzijā (35.1%), kam seko Klusā okeāna rietumu daļa (25.3%), Āfrika (21.4%), Vidusjūras austrumu daļa (20.6%), savukārt viszemākā izplatība tika konstatēta Amerikā (10.3%) un Eiropā (6%) (Bezabih et al., 2022).



1.1. att. Antimikrobiālās rezistences epidemioloģija apkārtējā vidē
(Boerlin & White, 2013)

ESBL producējošā *E. coli* molekulārā epidemioloģija. 1980. gados Eiropā baktērijām, kas bija saistītas ar nazokomiālajiem uzliesmojumiem, galvenokārt *Klebsiella pneumoniae*, tika aprakstīti pirmie ESBL enzīmi – TEM-1, TEM-2 un SHV-1, savukārt 1989. gadā gandrīz vienlaikus Vācijā un Argentīnā tika atzīta jauna ESBL enzīmu dzimta – CTX-M, pateicoties to spējai nodrošināt rezistenci pret cefotaksīmu. Ja vēl 1990. gados dominēja SHV un TEM varianti, tad pēc 2000. gada strauji sāka izplatīties CTX-M, pateicoties tā kodējošo gēnu lokalizācijai plazmīdās, integronos un to pozitīvām asociācijām ar noteiktiem veiksmīgiem baktēriju kloniem (piem., *E. coli* ST131), kā arī plašai cefalosporīnu lietošanai veterinārajā un humānajā medicīnā (Cantón et al., 2012; Cantón, Novais, et al., 2008).

Lai arī ESBL enzīmu TEM un SHV nozīme pakāpeniski samazinās, atsevišķiem variantiem, piemēram, TEM-26, TEM-52, SHV-5 un SHV-12 piemīt globāls raksturs, savukārt no CTX-M enzīmu dzimtas, visā pasaulē īpaši dominē CTX-M-1 grupas kodējošais gēns – *bla*_{CTX-M-15}, izņemot Latīņameriku, kur izteikti dominē *bla*_{CTX-M-2} (CTX-M-2 grupa). Globāli izplatīti arī CTX-M-9 grupas *bla*_{CTX-M-14} un *bla*_{CTX-M-27} gēni (Castanheira et al., 2021). Turklāt, CTX-M globalizāciju ilustrē ne tikai to klātbūtne cilvēkiem, bet arī produktīvajiem dzīvniekiem, pārtikā, lolojumdzīvniekiem un vidē (Ewers et al., 2012).

Aplūkojot ESBL producējošo *E. coli* *bla*_{CTX-M} gēnu izplatību dažādos pasaules reģionos, var secināt, ka Eiropā dominē CTX-M-1 grupas *bla*_{CTX-M-1} un *bla*_{CTX-M-15} gēni, taču Spānijā, Portugālē un Apvienotajā karalistē arī CTX-M-9 grupas *bla*_{CTX-M-9} un *bla*_{CTX-M-14} gēni. CTX-M-2 grupa galvenokārt ir aprakstīta Dienvidamerikā un Japānā, savukārt Ķīnā CTX-M-9 grupa

(*bla*_{CTX-M-14} un *bla*_{CTX-M-27}). ASV, Indijā un Ziemeļāfrikā bieži tiek identificēti CTX-M-1 grupas enzīmi (Day et al., 2019; Ramos et al., 2020).

Eiropā produktīvajiem dzīvniekiem izolētos ESBL producējošos *E. coli* kodē visbiežāk *bla*_{CTX-M-1}, kam seko *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} un *bla*_{TEM-52}. Arī cūkām Eiropā pārliecinoši visbiežāk ESBL producējošā *E. coli* kodējošais gēns ir *bla*_{CTX-M-1}, būtiski retāk citi *bla* gēni: *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTX-M-14} un *bla*_{CTX-M-2} un *bla*_{CTX-M-15} (Silva et al., 2019).

Vislielāko satraukumu rada ESBL producējošo baktēriju zoonotiskais potenciāls un fakts, ka *bla*_{CTX-M} gēni bieži nodrošina koprezistenci (co-rezistenci) pret citām "kritiski svarīgām antibiotikām", tādējādi tieši ietekmējot cilvēku veselību, samazinot terapeitiskās iespējas.

1.3. Barības piedevas kā alternatīva antibiotikām un veselības veicinātāji cūkām

Antibiotikām kā augšanas veicinātājiem ir bijusi būtiska nozīme cūkkopības nozares attīstībā vairāk nekā 50 gadus. To efektivitāte, lai palielinātu dzīvnieku augšanas ātrumu, uzlabotu barības izmantošanu, samazinātu saslīmstību un mirstību, kā arī uzlabotu reproduktīvo darbību, ir plaši dokumentēta (Cromwell, 2002). Taču no otras puses, pastāvīga antibiotiku lietošana ir veicinājusi pret antibiotikām rezistentu baktēriju selekciju. Turklāt antibiotiku lietošana var sekmēt tā saukto krustenisko rezistenci (t.i. rezistenci ne tikai pret lietoto antibiotiku, bet arī pret citu grupu antibiotikām) (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Ir neskaitāmi pētījumi, kas apstiprina, ka antibiotiku lietošana dramatiski maina mikrobioma ekoloģiju, rezistentākajiem organismiem kļūstot par dominējošo populāciju (Salyers & Amabile-Cuevas, 1997). Antibiotiku lietošana subterapeitiskās devās veicina rezistentās komensālās un oportūniskās baktērijas kļūt par dominējošiem pārstāvjiem zarnu mikrobiotā. Pateicoties rezistentu gēnu spējai grupēties mobilajos ģenētiskajos elementos – plazmīdās, transpozonos un integronos un spējai izplatīties ne tikai vertikāli, bet arī horizontāli konjugācijas ceļā, rezistentie gēni var tikt nodoti patogēnām baktērijām, kas padara antimikrobiālās rezistences problēmu sarežģītu un rada draudus ne tikai dzīvnieku, bet arī sabiedrības veselībai (Boerlin & White, 2013). Ņemot vērā pret antibiotikām rezistentu baktēriju globālo izplatību un tās radītās bažas sabiedrības veselībai, kopš 2006. gada 1. janvāra ir stājies ES spēkā aizliegums lietot antibiotikas kā augšanas veicinātājus dzīvniekiem, tostarp, cūku barībā.

Gan palielinoties izpratnei par antibiotiku negatīvo ietekmi, gan kā atbildes reakcija uz aizliegumu lietot antibiotikas dzīvnieku augšanas veicināšanai, zinātnes telpā ir sekmēta lielāka interese par cūku audzēšanu, neizmantojot antibakteriālos līdzekļus augšanas veicināšanai. Taču, atšķirībā no nobarojamajām cūkām, izslēdzot antibiotikas no tikko atšķirtu sivēnu barības, būtiski palielinās saslīmšanas un samazinātas augšanas riski (Cromwell, 2002). Tādēļ, lai izvairītos no negatīvās ietekmes, ko rada antibiotiku kā augšanas veicinātāju izņemšana no sivēnu diētas, ir nepieciešamas diētas stratēģijas un pārvaldības izmaiņas (Stein & Kil, 2006). Izmaiņu mērķim ir jābūt vērstam uz cūku organisma spēju samazināt patogēno baktēriju kolonizāciju zarnu traktā, ko var panākt ar uzlabotu imunoloģisko reakciju uz patogēniem. Var veicināt mehānismus, kas neļauj patogēniem piesaistīties zarnu gļotādai un izdalīt toksīnus, tādējādi samazinot patogēnu kaitīgo ietekmi uz saimniekorganismu. Kā daži no iespējamajiem alternatīvajiem līdzekļiem, kas ne tikai sniegtu pozitīvus efektus, bet pat novērstu antibiotiku negatīvos efektus, kā, piemēram, labvēlīgās mikrobiotas un dabiskās imunitātes nomācšanu, varētu būt **probiotikas, diētiskās šķiedras un ārstniecības augu izcelsmes barības piedevas**.

Saskaņā ar FAO un PVO 2001. gada sniegto definīciju – **probiotikas** ir dzīvi mikroorganismi, kas ievadīti atbilstošā daudzumā, labvēlīgi ietekmē saimniekorganisma veselību. Ir pierādīts, ka probiotiku iekļaušana barības devā uzlabo cūku vispārējo veselību un palielina vēlamo mikroorganismu skaitu zarnās, kā arī spēj samazināt patogēno mikroorganismu kaitīgo ietekmi (Liao & Nyachoti, 2017). **Diētiskās šķiedras** ir augu ēdamās

daļas atliekas un analogiski ogļhidrātiem, kas ir rezistenti pret sagremošanu un absorbciju cilvēku tievajā zarnā, taču pilnīga vai daļēja fermentācija tiek veikta resnajā zarnā. Tie satur polisaharīdus, oligosaharīdus, lignīnu un citas ar augiem saistītās vielas (AACC, 2001). Tām ir svarīga loma imūnās aizsardzības uzlabošanā un mikrobioma ekosistēmas uzturēšanā (Martens, 2016). **Ārstniecības augu izcelsmes barības piedevas** galvenokārt izmanto to aktīvo savienojumu – sekundāro metabolītu (alkaloīdu, fenolu, flavonoīdu, polisaharīdu) dēļ. Ārstniecības augiem un to produktiem piemīt antimikrobiālas, pretiekaisuma un antioksidantu īpašības, tie veicina sagremojamību un imunitāti, taču to lietošana barībā galvenokārt balstās uz to antimikrobiālo darbību (Omonijo et al., 2018).

1.3.1. Probiotiku ietekme uz sīvēnu veselības stāvokli un attīstību

Probiotikas tiek iedalītas trīs galvenajās grupās: *Bacillus* spp., pienskābi producējošās baktērijas un raugi (NRC, 2012). *Bacillus* spp. saturošas probiotikas veido sporas, tie ir termostabili un spēj izdzīvot zemā pH. Tiem raksturīga spēcīgu ekstracelulāro šķiedru noārdošo enzīmu ražošana, kas var veicināt barības vielu sagremošanu un izmantošanu (Y. Liu et al., 2018). Zīdējsivēnu traktā dominē pienskābi producējošās baktērijas, kas fermentācijas ceļā ražo pienskābi – tā palīdz samazināt pH līmeni un kavē patogēnu kolonizāciju zarnās, turklāt uzlabo saimniekorganisma imunitāti (de Lange et al., 2010). Savukārt atšķirtajiem sīvēniem pienskābo baktēriju koncentrācija samazinās, tādēļ to pievienošana barībai var uzlabot zarnu veselību. Pienskābās baktērijas modulē mikrobiotu, kontrolē patogēnus (Liao & Nyachoti, 2017), uzlabo imūno regulējumu un reakciju (Smelt et al., 2013), palielina barības vielu sagremojamību, kā arī uzlabo cūku vispārējo veselības stāvokli un augšanas rādītājus (H. Liu et al., 2015). Raugi var palielināt vidējo diennakts uzņemto barības devu (ADFI), uzlabot gļotādas imunitāti, veicināt zarnu attīstību, adsorbēt mikotoksīnus, modulēt zarnu mikrobiotu un samazināt atšķirti sīvēniem diarejas sastopamību (Y. Liu et al., 2018).

Probiotiku darbības mehānisms. Atšķirībā no antibiotikām, kuru darbība ir vērsta gan uz labvēlīgo, gan kaitīgo baktēriju skaita samazināšanu, probiotikas ir paredzētas, lai veicinātu labvēlīgo celmu adhēziju zarnu gļotādai un tās kolonizāciju (Liao & Nyachoti, 2017). Probiotikas veicina virkni labvēlīgu efektu uz cūku gremošanas traktu un vispārējo veselības stāvokli, izmantojot vairākus mehānismus, diemžēl ne visi no tiem šobrīd ir zināmi (Zimmermann et al., 2016).

Probiotikas, nonākot cūku gremošanas traktā, turpina dzīvot un, pirmkārt, kolonizē zarnu mikrobiotas kopienas. Probiotikas spēj izplatīties no gremošanas trakta uz ekstragremošanas vietām ar dendrītisko šūnu palīdzību, penetrējot epitēlija šūnas vai satverot baktērijas tieši no zarnu lūmena. Probiotiku un dendrītisko šūnu mijiedarbības rezultātā tiek sekmēta imūnmodulācija (Fairbrother et al., 2005). Būtisks aspekts, ka probiotikas spēj adhezēt pie saimniekšūnām, kas sekmē baktēriju kolonizāciju saimniekorganismā, turklāt tas veicina patogēno baktēriju elimināciju jeb mehānisku izvadīšanu no saimniekorganisma. Probiotikas, pateicoties skropstiņām jeb pili (matiem līdzīgas organellas, kas izvirzītas no baktēriju virsmas), atpazīst saimniekorganisma dažādas klases molekulas, ieskaitot zarnu gļotādas transmembrānu proteīnus, piemēram, integrīnus un kadherīnus vai arī ārpusšūnas matricas sastāvdaļas (kolagēnu, fibronektīnu, laminīnu vai elastīnu) un tādējādi veic adhēziju pie saimniekšūnām (Plaza-Díaz et al., 2019).

Kā nākamie probiotiku darbības mehānismi ir konkurētspējīgu patogēnu izslēgšana, bakteriocīnu, fermentu un īso ķēžu taukskābju ražošana (SCFA). “Konkurētspējīga izslēgšana” nozīmē, ka viena baktēriju suga konkurē par receptoru vietām zarnu traktā intensīvāk nekā citas sugas (Plaza-Díaz et al., 2017). Papildus spēj samazināt vai novērst patogēnu adhēziju, izslēdzot konkurenci. Tās modulē saimniekorganisma imūnreakciju, veicina zarnu sienas barjeras integritāti un ražo vielas (baktericīdus, organiskās skābes, ūdeņraža peroksīdu), kas var inhibēt Gram pozitīvās un Gram negatīvās baktērijas. Plaši zināma probiotiku spēja ražot SCFA

(propionātu, butirātu, acetātu). Cūkas SCFA izmanto kā enerģijas avotu, turklāt tās samazina pH līmeni zarnās, kas var kavēt patogēno baktēriju augšanu un kolonizāciju. Turklāt probiotikas var noārdīt cieti nesaturošus polisaharīdus līdz cukuriem, kas var kalpot kā enerģijas avots cūkām (Y. Liu et al., 2018).

Probiotikas var ražot svarīgus gremošanas fermentus, kas uzlabo barības sagremojamību, tādējādi sekmējot attīstību un svara pieaugumu (L. Hao et al., 2020). Taču būtiskākais mehānisms cūkām tiek saistīts ar zarnu mikrobiotas modulāciju, kā rezultātā samazinās sasilšanās sastopamība un uzlabojas augšanas rādītāji.

Probiotikas var lietot visos cūku audzēšanas posmos, taču visbiežāk tās tiek lietotas sivēniem pēcatšķiršanas periodā. Ir pierādījumi, ka probiotikas ir efektīvākas dzīvniekiem mikrobiotas veidošanās laikā, tas ir, sivēna vecumā, jo tiem vēl nav izveidojusies stabila zarnu mikrobiota, īpaši pēc atšķiršanas no sivēnmātes. Cūkkopībā atšķiršanas periods ir saspringts – sivēni saskaras ar stresu, ko izraisa uztura un vides maiņa – kas savukārt, sekmē zarnu trakta un imūnās sistēmas disfunkciju, gremošanas traucējumus un raksturojas ar vislielāko kritušo sivēnu skaitu, ko izraisa ETEC. Šajā periodā probiotikas samazina saslimstības rādītājus, atjauno mikrobiotas līdzsvaru un stimulē imunitāti (Liao & Nyachoti, 2017).

Visbiežāk probiotikas atšķirtiņiem sivēniem modulē zarnu mikrobiotu – palielinot labvēlīgo baktēriju skaitu un novēršot patogēnu (*E. coli*, *Salmonella enterica*) kolonizāciju, sekmē zarnu gļotādas attīstību, audu nobriešanu un integritāti, palielina gremošanas enzīmu ražošanu, uzlabojot sagremojamību, stimulē imūnsistēmu un palielina produktivitāti (de Lange et al., 2010; Pereira et al., 2022).

Piemēram, sivēniem pēc *Saccharomyces cerevisiae* iekļaušanas barības devā, no 14 līdz 35 dienu vecumam, stimulēja zarnu imunitāti, palielinot gļotādas IgA sekrēciju *jejunum*, pazemināja zarnu pH, samazināja *E. coli* skaitu *ileum* un *cecum* saturā, bet vienlaikus palielināja *Lactobacillus* spp. skaitu (C. Zhu et al., 2017). Kādā citā pētījumā, izmantojot vairāku celmu probiotikas (*Lactobacillus* spp. un *Bifidobacterium* spp. maisījums), novēroja histoloģiskas izmaiņas zarnu gļotādā – palielinātu kausveida šūnu skaitu kriptās, mainītu mucīnu ogļhidrātu sastāvu un samazinātu kriptu dziļumu (Desantis et al., 2019).

Probiotiku spēju aizstāt antibiotikas kā augšanas veicinātājus ir apstiprināta vairākos pētījumos, piemēram, Zhao un Kim ziņoja, ka, iekļaujot atšķirtu sivēnu barības devā probiotikas (*Lactobacillus reuteri* un *L. plantarum*) tika iegūti līdzvērtīgi augšanas rezultāti (vidējais diennakts pieaugums) kā barojot ar diētu, kas satur 0.01% apramicīna. Turklāt palielinājās *Lactobacillus* spp. un samazinājās *E. coli* koncentrācija fekālijās (Y. Liu et al., 2018). Savukārt Trckova ziņotie rezultāti liecina, ka barības bagātināšana ar dzīvā rauga *Saccharomyces cerevisiae* piedevu sivēnmātēm vēlīnā grūsnības periodā, kā arī zīdējsivēniem un atšķirtajiem sivēniem ir noderīga, lai samazinātu enterotoksigēnā *E. coli* (ETEC) ar viciņu antigēnu F4 (K88) izraisītās diarejas ilgumu un smagumu – būtiski samazinot ikdienas diarejas sastopamības rādītājus, diarejas ilgumu, patogēno ETEC skaitu fekālijās (Trckova et al., 2014).

1.3.2. Griķu klijas kā diētisko šķiedru avots un to ietekme uz sivēnu veselības stāvokli un attīstību

Parasto griķu (*Fagopyrum esculentum* L.) kliju galvenās ķīmiskās sastāvdaļas ir ciete (41%), diētiskās šķiedras (26%), t.sk., šķīstošās (1%) un nešķīstošās (25%), proteīni (22%), tauki (7%) un minerālvielas (4%) (Bonafaccia et al., 2003).

Parasto griķu ciete ir rezistentās cietes avots, tās saturs svārstās 33.5-37.8% no kopējā cietes daudzuma (Van Hung et al., 2009). Rezistentā ciete (lineāra α -1,4-D-glikāna molekula) netiek sagremota tievajā zarnā, taču kā fermentācijas substrāts pilnīgi vai daļēji tiek izmantots resnajā zarnā un ieguvumi ir līdzīgi tiem, ko novēro diētiskajām šķiedrām. Uztura ziņā rezistentā ciete kopā ar citiem cieti nesaturošajiem polisaharīdiem un nesagremojamiem oligosaharīdiem uzskata par nesagremojamajiem ogļhidrātiem. Rezistentās cietes frakcijai ir

pretrunīgs statuss sivēnu ēdināšanā, jo var pasliktināt enerģētisko efektivitāti, taču tai pašā laikā tas darbojas kā potenciālais prebiotiku avots – selektīvi stimulējot specifisku baktēriju populāciju augšanu un aktivitāti resnajā zarnā. Turklāt rezistentās cietes frakcija, kurai ir līdzīgas īpašības ar diētiskajām šķiedrām, var pozitīvi ietekmēt fermentāciju cūku zarnās, paaugstinot SCFA saturu, sekmēt zarnu kustības, stimulēt zarnu imunitāti un uzlabot vispārējo saimniekorganisma veselības stāvokli (Giuberti et al., 2015). Fermentējot cieti resnajā zarnā, veidojas gaistošās taukskābes (acetāts, propionāts, butirāts) (Haenen et al., 2013). Gaistošās taukskābes ir būtisks trofisks stimulēš resnajām zarnām, tās samazina zarnu pH, rezultātā samazinot patogēnu kolonizāciju. Butirāts tiek viegli metabolizēts oksidācijas ceļā mitohondrijos un ir svarīgs enerģijas avots resnās zarnas epitēlija šūnām, tādējādi var sekmēt kolonocītu augšanu, attīstību un atjaunošanos. Turklāt trofiskā ietekme ir novērojama arī tievo zarnu gļotādā, palielinot tukšās zarnas bārkstiņu augstumu, virsmas laukumu un kriptu dziļumu (Cook & Sellin, 1998). Rezistentā ciete kā fermentācijas substrāts spēj modulēt mikrobiotu resnajā zarnā, ietekmējot noteiktu populāciju daudzumu – palielinot *Lactobacillus* spp. un *Bifidobacterium* spp. (Bird et al., 2007), bet samazinot *Escherichia coli* un *Pseudomonas* spp. (Haenen et al., 2013) skaitu, taču mikrobiotas modulācija ir tiešā veidā saistīta ar sākotnējo mikrobiotas sastāvu un rezistentās cietes kristāliskais polimorfisms var selektīvi veicināt noteiktas baktēriju grupas attīstību dažādās zarnu vietās (Haenen et al., 2013).

Griķu šķiedras frakcija sastāv no hemicelulozes (39%), celulozes (39%), lignīna (20%) un pektīniem (1.8%) (D. Zhang et al., 2020). Hemicelulozi galvenokārt veidoja ksiloglukāni (D. Zhang et al., 2020), turklāt griķu polisaharīdu sastāvs ir līdzīgāks augļu un dārzeņu, nevis graudaugu sastāvam. Šķiedru polisaharīdi raksturojas ar vairākām bioloģiskajām funkcijām, piemēram, antioksidatīva, zarnu mikrobiotas un imunitāti modulējoša darbība, kā arī spēj saistīt žultskābes, darbojas kā kuņģa gļotādas protektants un piemīt antikancerogēna darbība (F. Zhu, 2020).

Antioksidatīvā darbība tiek saistīta ar polisaharīdu cukuru vienību hidroksilgrupu spēju saistīt brīvos radikāļus, taču, jāņem vērā, ka polisaharīdi ir konjugēti vai atrodas maisījumos ar polifenoliem, kā rezultātā nevar izslēgt to lomu šajās antioksidatīvajās reakcijās (J. Wang et al., 2016).

Dabiskos polisaharīdus zarnu mikrobiota fermentē resnajā zarnā par gāzēm (ūdeņradi, metānu un oglekļa dioksīdu) un organiskajām skābēm (pienskābi un SCFA). Organiskās skābes, īpaši SCFA, ir vissvarīgākais fermentācijas produkts, jo tas uzlabo zarnu mikroviidi un veicina imūnmodulāciju. Polisaharīdiem piemīt spēja gan stimulēt imūnatbildi, gan arī nomākt pārmērīgas imūnās atbildes, ko izraisa dažādi stimulētājfaktori. Pamātā ir divi imūnmodulējošie mehānismi, pirmkārt, polisaharīdi var iedarboties tieši uz imūnsistēmas šūnām, nomācot vai aktivizējot tās; otrkārt, polisaharīdi var netieši ietekmēt imūnās atbildes reakcijas, iedarbojoties uz zarnu mikrobiotu. Imūnstimulējošā darbība tiek panākta, veicinot labvēlīgās mikrobiotas attīstību un stiprinot imūno šūnu darbību. Savukārt pārmērīgas iekaisuma reakcijas var tikt nomāktas, mainot mikrobiotas sastāvu, stiprinot zarnu barjeras funkcijas, veicinot SCFA ražošanu, uzlabojot antioksidantu darbību un samazinot pro-iekaisuma mediatoru sekrēciju (Tang et al., 2019). Oh ar līdzautoriem ir pētījis griķu šķiedrvielu polisaharīdu imūnmodulējošo aktivitāti *in vitro* un *in vivo*. *In vitro* griķu polisaharīdu frakcijas stimulēja makrofāgu augšanu un aktivitāti, samazinot apoptozi. *In vivo*, imūnsupresīvo peļu modeļos ir pierādīta spēja palielināt liesas un aizkrūts dziedzeru indeksus, leukocītu skaitu asinīs, uzlabot makrofāgu fagocītisko aktivitāti un mazināt alerģijas. Tomēr, ņemot vērā, ka eksperimentos izmantotie polisaharīdi saturēja arī 5% polifenolu, nevarēja izslēgt arī polifenolu izraisīto efektu imūnmodulēšanas reakcijās (Oh et al., 2018). Turklāt, ņemot vērā, ka vairums fenolu un polisaharīdu bioloģiskās funkcijas pārklājas, piemēram, antioksidatīvā, antikancerogēnā un imūnmodulējošā aktivitāte, Zhu ir izvirzījis hipotēzi, ka to darbība ir savstarpēji sinerģiska (F. Zhu, 2020).

Vairums pētījumu apstiprina, ka diētiskās šķiedras neveicina vai pat kavē augšanas rādītājus cūkām, jo samazinās barības vielu sagremojamība un enerģijas nogulsnešanās, taču

rezultāti nav viennozīmīgi, jo sivēniem diētiskās šķiedras pat var veicināt augšanas rādītājus, kas tiek panākts, uzlabojot zarnu veselību, proti, Zhao ar līdzautoriem ziņoja, ka atšķirtiem sivēniem uzlabojās vidējais diennakts pieaugums (ADG) un barības konversijas koeficients (FCR) iekļaujot barības devā 5% kukurūzas vai kviešu klijas – diētiskās šķiedras mainīja zarnu mikrobiotu, uzlaboja zarnu veselību un sekmēja butirāta veidošanos zarnās (Zhao et al., 2018).

1.3.3. Augu izcelsmes piedevu ietekme uz sivēnu veselības stāvokli

Augu izcelsmes barības piedevas galvenokārt satur augu ekstraktus – sekundāros augu metabolītus, kas piešķir augiem smaržu un krāsu. Augu ekstrakti sastāv no ļoti daudziem komponentiem un tiek iedalīti divās lielās formās: pulverveida un šķidrā eļļā, kas ir ūdenī nešķīstoša un tiek saukta par ēterisko eļļu. Aizliedzot antibiotiku lietošanu kā produktīvo dzīvnieku augšanas veicinātājus, tas radīja interesi pievienot barībai augu ekstraktus, lai uzlabotu dzīvnieku veselību un produktivitāti. Pateicoties augu ekstraktu bioloģiskajām funkcijām – antimikrobiālajai, antioksidatīvajai un pretiekaisuma darbībai – tos sekmīgi var pielietot, lai aizstātu antibiotiku lietošanu barībā. Līdzšinējie pētījumi apstiprina augu ekstraktu pozitīvo ietekmi uz cūku veselību, izmantojot vairākus mehānismus – tiešu patogēnu proliferācijas nomākšanu, zarnu mikrobiotas modulāciju un imūno funkciju uzlabošanu (Y. Liu et al., 2018).

Augu ekstraktiem piemīt plašs antimikrobiālās darbības spektrs gan pret Gram pozitīvajām, gan pret Gram negatīvajām baktērijām, tostarp, *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium* ģints pārstāvjiem. Antimikrobiālo aktivitāti galvenokārt nodrošina ekstraktu hidrofobitāte un monoterpēnu, aromātisko monoterpenoīdu klātbūtne (Dorman & Deans, 2000).

Augu bioaktīvie komponenti var novērst vai mazināt baktēriju virulenci. Ir zināms, ka zarnu patogēnu virulences faktoru ekspresijai ir būtiska kvoruma noteikšana. Kvoruma noteikšana (QS) ir baktēriju šūnu savstarpējās saziņas process, kam ir būtiska nozīme gan baktēriju virulencē, gan rezistencē pret patogēniem, un ir atkarīgs no baktēriju populācijas blīvuma un tiek mediēts ar mazām difūzām signālmolekulām (acilētiem homoserīna laktoniem (AHL)). Ir pierādīta dažu ēterisko eļļu spēja inhibēt kvoruma noteikšanu. Piemēram, divšķautņu asinszāles (*Hypericum perforatum*) etanola, metanola un acetona ekstrakti spēj inhibēt *Pseudomonas aeruginosa* QS signalizācijas ceļus (Doğan et al., 2019). Spēcīga biomembrānu veidošanas un kvoruma noteikšanas inhibējošā darbība tika konstatēta parastā timiāna (*Thymus vulgaris*) ēteriskajai eļļai (Cáceres et al., 2020). Kvoruma noteikšanas inhibēšana ļautu mazināt baktēriju patogenitāti, rezistenci pret antibiotikām un biomembrānu veidošanu lokālās un sistēmiskās infekcijās (Szabó et al., 2010).

Starp polifenolu savienojumiem, augos plaši izplatīti ir flavonoīdi, kam ir pierādīta farmakoloģiska aktivitāte – antioksidatīva iedarbība, pateicoties to funkcionālajām hidroksilgrupām, tie spēj neitralizēt brīvos radikāļus vai veidot metālu helātu jonus. Metālu helātu veidošanās ir būtiska, lai novērstu radikāļu veidošanos, kas bojā mērķa biomolekulas (Kumar & Pandey, 2013). Intensīvā cūkkopībā daudzi faktori (dzimšana, atšķiršana, mikotoksīnu piesārņojums barībā, sociālie un vides faktori) var rosināt organismu radīt lielu skaitu brīvos radikāļus, kas cūkām, īpaši sivēniem, var izraisīt oksidatīvos bojājumus. Cūku zarnu trakts ir galvenais brīvo radikāļu uzbrukuma mērķorgāns, kas izraisa zarnu gļotādas struktūras iznīcināšanu, mikrobiotas traucējumus, traucētu barības vielu uzsūkšanos, samazinātu barības uzsūkšanu un kas rezultējas ar negatīvu sivēnu svara pieaugumu un paaugstinātu jutību uz infekcijas slimībām (Y. Hao et al., 2021). Flavonoīdi, nonākot kuņģa-zarnu traktā, var iedarboties tieši – saistīt brīvos radikāļus un iedarboties uz gremošanas trakta epitēliju, endokrīnajām, imūnsūnām, kā arī uz zarnu lūmena saturu, tādējādi spēj stiprināt zarnu barjeru, samazināt infekcijas un sekmēt sivēnu augšanu (Yuan et al., 2017). Savukārt resnajā zarnā polifenolus fermentē zarnu mikrobiota, veidojot jaunus bioaktīvus metabolītus, kas var

izraisīt prebiotikām līdzīgu zarnu mikrobiotas modulāciju ar noteiktu baktēriju celmu selektīvu augšanas veicināšanu (Thumann et al., 2019).

Ir iegūti pierādījumi, ka kvercetīns (flavonoīds) ir efektīvs barības bagātinātājs, lai uzlabotu zarnu integritāti transportēšanas stresa apstākļos pakļautām cūkām. Pētījuma rezultāti liecināja, ka kvercetīns būtiski samazināja endotoksīnu līmeni serumā un uzlaboja zarnu veselību – tika novērots augstāks tievās zarnas *jejunum* daļas bārktīņu augstums, un palielināta okludīna un *zonula occludens* proteīna mRNS ekspresija *jejunum*. Turklāt novēroja būtiski zemāku skābekļa brīvo radikāļu un malon-dialdehīda līmeni tievās zarnas *jejunum* daļā, kas, savukārt, sekmē zarnu integritāti un samazina zarnu caurlaidības pakāpi cūkām (ZOU et al., 2016). Savukārt flavonola glikozīdam ikarīnam novērotas būtiskas pretiekaisuma un antioksidatīvas īpašības. Tas spēj regulēt epitēlija šūnu iekaisuma reakcijas un mazināt oksidatīvo stresu. Tā darbība tika pierādīta eksperimentā ar atšķirtajiem sivēniem – pirmapstrāde ar ikarīnu mazināja enterotoksigēnā *E. coli* K88 izraisītu zarnu barjeras funkciju traucējumus, samazinot zarnu caurlaidību un diareju, kā rezultātā dod iespēju tā izmantošanai zarnu barjeras disfunkciju profilaksē un ārstēšanā (Xiong et al., 2020).

Augu ekstraktu pretiekaisuma iedarbība ir plaši identificēta šūnu kultūru modeļos *in vitro* un *in vivo*. Iekaisums ir atbildes reakcija uz infekcijas izraisītāju (mikroorganismi un to toksīni), fizikālo vai ķīmisko faktoru radītiem šūnu bojājumiem ar mērķi atjaunot homeostāzi. Tomēr ilgstoša iekaisuma mediatoru atbrīvošana var sekmēt proiekaisuma stāvokli (C. H. Liu et al., 2017). Augu sekundārajiem metabolītiem – flavonoīdiem, alkaloīdiem, terpēniem un polifenoliem, piemīt pretiekaisuma darbība. Tie spēj samazināt vai pat pilnīgi pārtraukt iekaisuma aktivitāti. Daudzi flavonoīdi, polifenoli samazina pro-iekaisuma citokīnu ekspresiju, piemēram, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β makrofāgos, tuklajās šūnās, perifēro asiņu mononukleārajās šūnās un T limfocītos (Yahfoufi, Alsadi, et al., 2018). Ir pierādīts, ka polifenoli var iesaistīties dažādos iekaisuma mediētos signālceļos (nukleārā faktora kB aktivācijas, arahidonskābes un mitogēna aktivētās proteīnkināzes (MAPK)) un veikt bloķēšanu dažādos to punktos un līmeņos. Darbības pamatā ir dažādu enzīmu – ATFāzes, prostoglandīnu, ciklooksigenāzes, lipoksigenāzes, NADH oksidāzes, proteīnkināzes, peroksidāzes, metallopeptidāzes, fosfolipāzes A2 inhibēšana (Yahfoufi, Alsadi, et al., 2018).

Augu ekstraktu ietekme uz dzīvnieka augšanas rādītājiem ir pretrunīga, taču ir pierādīta to spēja uzlabot zarnu veselību, modulējot zarnu mikrobiotu un imunitāti (Y. Liu et al., 2018). Michiels norādīja, ka 500 mg kg⁻¹ timola un karvakrola izēdināšana atšķirtiem sivēniem samazināja intraepitēliālo limfocītu skaitu un palielināja bārktīņu augstuma un kriptu dziļuma attiecību tievās zarnas distālajā daļā, tādējādi norādot uz spēju uzlabot zarnu veselību (Michiels et al., 2010). Izēdinot sešas nedēļas sivēniem augu maisījuma piedevu (griķi, timiāns, kurkuma, melnie pipari un ingvers) 250 mg kg⁻¹, neietekmēja augšanas rādītājus, taču uzlabojās barības vielu sagremojamība, tika novērots salīdzinoši augstāks limfocītu skaits un samazinājās *E. coli* koncentrācija fekālijās (Yan et al., 2012).

1.4. Ēteriskās eļļas un to antibakteriālā darbība

Ēteriskās eļļas jeb aromātiskās augu esences ir gaistošas, smaržīgas vielas ar eļļainu konsistenci, ko ražo augi. Tos sintezē visi augu orgāni, t.i., pumpuri, ziedi, lapas, stublāji, sēklas, augļi, saknes, miza, parasti koncentrācija augos ir 0.1-1%, bet dažos var sasniegt arī 10% (Noriega, 2021) un tiek uzglabāti augu sekretārajās šūnās, dobumos, epidermas šūnās (Stratakos & Koidis, 2016).

Ēterisko eļļu ekstrahēšanai var izmantot vairākas metodes, nereti tas ir kādas noteiktas metodes modifikācija, taču ieguves pamatmetodes ir hidrodestilācija, ekstrakcija ar superkritisko CO₂, ekstrakcija ar šķīdinātājiem un ekspresija zem spiediena jeb presēšanas ceļā (Rassem et al., 2016).

Ēteriskās eļļas (gaistošās eļļas) ir sarežģīti augu biosintezēti gaistošo savienojumu maisījumi, kuros var būt 20-60 savienojumi dažādās koncentrācijās, kopīgā īpašība ir spēja iztvaikot istabas temperatūrā. Vissvarīgākās sastāvdaļas ir terpēni un aromātiskie monoterpenoīdi. Terpēni ir vislielākā grupa, tie satur monoterpēnus (ogļūdeņražu monoterpēnus un skābekļa monoterpēnus) un seskviterpēnus (ogļūdeņraža seskviterpēnus un skābekļa seskviterpēnus). Monoterpēnus veido 10 oglekļa atomi un tie veidojušies, savienojoties divām izoprēna vienībām, savukārt seskviterpēni veidoti no 15 oglekļa atomiem un veidojušies no trīs izoprēna vienībām. Atkarībā no ķīmiskās funkcionalitātes, terpēni un terpenoīdi var būt alkoholi (linalols, geraniols, karveols, citronelols, terpeneols, mentols, borneols), aldehīdi (citrāls, citronelāls), fenoli (timols, karvakrols), ketoni (karvons un kampars), ēteri (eikaliptols) un ogļūdeņraži (cimēns, pinēns, limonēns, fellandrēns) (Guimarães et al., 2019; Noriega, 2021).

Guimaraes ar līdzautoriem ir novērtējis 33 biežāk ēteriskajās eļļās sastopamo terpēnu antibakteriālo aktivitāti. Visiem pārbaudītajiem seskviterpēniem un lielākajai daļai ogļūdeņražu terpēnu minimālā inhibējošā koncentrācija bija augstāka nekā 0.25mg mL⁻¹. Sešpadsmit komponenti ar MIC 0.25mg mL⁻¹ un zemāku, attēloti 1.1. tabulā. Visaugstākā antibakteriālā darbība tika novērota fenoliem – timolam, karvakrolam un eugenolam (1.1. tabula) (Guimarães et al., 2019). Taču, ņemot vērā, ka MIC robeža ir atkarīga no baktēriju celma un, tā kā ēterisko eļļu MIC noteikšanas metodes nereti ir modificētas, ēterisko eļļu komponentu MIC vērtības zinātniskajā literatūrā mēdz atšķirties (Cho et al., 2020).

1.1. tabula

Ēterisko eļļu komponentu un sulfanilamīda minimālā inhibējošā koncentrācija (mg mL⁻¹) pret dažādu sugu baktērijām (Guimarães et al., 2019)

Terpēnu grupa/ sulfanilamīds	Savienojums	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ogļūdeņražu terpēni	m-Cimēns	0.25	0.25	0.25	0.25
skābekļa terpēni	(-)-Borneols	0.12	0.12	0.25	0.03
	(-)-Borneols	0.25	0.25	0.25	0.25
	(±)-Kampars	0.25	0.25	0.25	0.015
	L-Karveols	0.12	0.03	0.06	0.015
	L-Karvons	0.25	0.12	0.06	0.03
	Citrāls	0.06	0.07	0.06	0.06
	Citronelāls	0.12	0.12	0.25	0.25
	β-Citronelāls	0.12	0.12	0.25	0.03
	trans-geraniols	0.07	0.03	0.06	0.03
	R-(+)-Limonēns	0.25	0.06	0.25	0.25
	Linalols	0.25	0.25	0.25	0.25
	Terpineols	0.12	0.12	0.06	0.03
fenoli	Timols	0.007	0.003	0.007	0.007
	Karvakrols	0.03	0.015	0.03	0.015
	Eugenols	0.07	0.07	0.03	0.003
Sulfanilamīds*		R	0.06	0.03	0.06

* – pozitīvā kontrole, R – rezistents.

Galvenie jeb dominējošie komponenti (ķīmiskie savienojumi, kas veido lielāko gaistošo vielu procentuālo daļu no kopējās gaistošo savienojumu koncentrācijas) var veidot līdz pat 85% no ēteriskās eļļas satura, taču pārējie komponenti novērojami salīdzinoši mazā, pat niecīgā procentuālā daudzumā (Chouhan et al., 2017). Ēterisko eļļu antibakteriālo darbību nosaka tās

sastāvs, aktīvo komponentu funkcionālās grupas un to mijiedarbība, turklāt antimikrobiālo aktivitāti nosaka darbības mehānisms, kas ir atkarīgs no ēteriskās eļļas veida un baktērijas celma (Dorman & Deans, 2000). Līdzšinējie pētījumi liecina, ka aromātisko savienojumu kodoli ar polāru funkcionālo grupu ir atbildīgi par antibakteriālo aktivitāti, taču mehānisms līdz šim nav pilnīgi izprasts. Pateicoties tam, ka ēteriskās eļļas satur lielu skaitu dažādu ķīmisko savienojumu, visticamāk, to antibakteriālā darbība pret baktērijām nav attiecināma uz vienu konkrētu mehānismu, bet tā ir vērsta uz vairākiem strukturāliem mērķiem baktēriju šūnā (Burt, 2004). Iespējamie mehānismi un iedarbības mērķi visbiežāk ir šūnu sienas noārdīšana, citoplazmas membrānas bojājumi, šūnas satura noplūde, citoplazmas koagulācija (Burt, 2004) un izmaiņas šūnas membrānas jonu kanālos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} vai Cl^-), palielināta membrānas caurlaidība, membrānas plīsums un mērķa enzīmu inhibīcija (Oz et al., 2015). Ne visi šie ir atsevišķi ēteriskās eļļas darbības mehānismi vai mērķi, daži no tiem ir cita mehānisma sekas.

Būtiska nozīme ir ēteriskās eļļas hidrofobitātei, kas ļauj tai saistīties un izjaukt baktēriju šūnas membrānas un mitohondriju lipīdus. Izjaucot baktēriju struktūras, palielinās to caurlaidība un seko jonu un šūnas satura noplūde. Lai gan baktērijas noteiktu šūnas satura noplūdi var panest bez dzīvotspējas traucējumiem, taču plašs šūnas satura zudums vai kritisks jonu un molekulu zudums izraisa baktērijas bojāeju. Taču ir arī pierādījumi par ēterisko eļļu izraisītu baktēriju šūnu nāvi pirms to līzes (Burt, 2004).

Parasti vispēcīgākā antibakteriālā aktivitāte ir novērota ēteriskajām eļļām, kas satur lielu procentuālo fenolu (timola, karvakrola un eugenola) daudzumu (Dorman & Deans, 2000). Šo fenolu darbības mehānismi ir līdzīgi; parasti novēro citoplazmas membrānas traucējumus, traucētu elektronu plūsmu un šūnas satura koagulāciju un noplūdi.

Atsevišķu ēteriskās eļļas komponentu ķīmiskā struktūra ietekmē ēteriskās eļļas precīzu darbības mehānismu un antibakteriālo aktivitāti. Ļoti būtiska ir hidroksilgrupas klātbūtne fenola savienojumos (Dorman & Deans, 2000), taču antibakteriālās darbības pakāpi salīdzinoši maz ietekmē hidroksilgrupas pozicionālais novietojums (kas izskaidro timola un karvakrola līdzīgo antibakteriālo aktivitātes pakāpi). Savukārt fenola gredzena (destabilizēto elektronu) būtisko nozīmi pierāda mentola samazinātā antibakteriālā aktivitāte, salīdzinot ar karvakrolu (Ultee et al., 2002). Vēl viens aspekts, kas ietekmē ēterisko eļļu aktivitāti, ir dubultās saites ieviešana, kas palielina aktivitāti pret Gram negatīvajām baktērijām (Nieto, 2017). Limonēns ir ar augstāku antibakteriālo darbību kā *p*-cimēns, jo tas satur dubulto saiti, kas rodas, pateicoties alkenil- grupas pievienošanai, turklāt alkilēšana pastiprina antibakteriālo darbību (Dorman & Deans, 2000).

Kā nākamais ēterisko eļļu mērķis ir šūnu proteīnu denaturācija, piemēram, fermenta ATFāzes, kas iestrādātas citoplazmas membrānā un organellās, lai transportētu dažādus jonus caur baktērijas membrānu. Iespējami divi mehānismi: lipofīlās ogļūdeņražu molekulas var uzkrāties lipīdu dubultslānī un izkropļot lipīdu-olbaltumvielu mijiedarbību; lipofīlie savienojumi var tieši mijiedarboties ar hidrofobajām proteīna daļām. Proteīnu saistīšanās rezultātā tiek inhibētas aminoskābju dekarboksilāzes baktēriju šūnās (Burt, 2004).

Timols un karvakrols ir timiāna un raudenes ēterisko eļļu galvenie komponenti – strukturāli izomēri, kas atšķiras ar hidroksilgrupas izvietojumu citā fenola gredzena vietā. Ultee ir pētījis karvakrola ietekmi uz *Bacillus cereus*. Viņš konstatēja, ka tas, mijiedarbojas ar šūnas membrānu, saistās un šķīdina fosfolipīdu dubultslāni. Fosfolipīdu dubultslāņa fiziskās struktūras izkropļojums izraisa membrānas paplašināšanos, sašķidrināšanos un palielina tās caurlaidību. ATF līmenis baktēriju šūnas iekšpusē būtiski samazinās, taču ārpusē tā līmeņa pieaugumu nenovēroja, kas norāda uz ATF sintēzes inhibēšanu vai ATF hidrolīzi. Membrānas potenciāls pēc apstrādes ar karvakrolu būtiski samazinās, kas norāda uz samazinātu protonu dzinējspēku. Tika izmainīts pH, turklāt intracelulāri būtiski samazinājās kālija jonu daudzums, bet pieauga – ekstracelulāri. Tika secināts, ka karvakrols veido poras membrānā, izspiežot fosfolipīdu taukskābju ķēdes un ļaujot joniem iziet no citoplazmas. Turklāt samazināts vides pH var pastiprināt karvakrola hidrofobitāti (Ultee et al., 2002).

Arī citi autori ir apstiprinājuši, ka timola un karvakrola hidrofbobitāte veicina afinitāti un akumulāciju starp baktēriju šūnas lipīdu divslāņu taukskābju ķēdēm baktērijas šūnas membrānā un samazina tās integritāti. Taču hidroksilgrupa ir noteicošais faktors antibakteriālajai aktivitātei. Pateicoties delokalizētai elektronu sistēmai un hidroksilgrupai, timols un karvakrols spēj samazināt pH un membrānas potenciālu, aktivizējot protonu apmaiņu, tādējādi samazinot ATF sintēzi un izraisot šūnas nāvi (Ben Arfa et al., 2006).

Eugenols ir galvenā krustnagliņu eļļas sastāvdaļa. Ir pierādīts, ka tas inhibē amilāzes un proteāžu ražošanu *Bacillus cereus*, izraisa baktēriju šūnas sienas bojājumus un līzi. Saistoties eugenola hidroksilgrupai ar proteīniem, tiek pārtraukta enzīmu darbība (Burt, 2004).

p-cimēns ir karvakrola prekursors, kas izraisa membrānas pietūkumu lielākā mērā kā karvakrols (Ultee et al., 2002), taču tam nav antibakteriālas darbības, lietojot vienu pašu (Dorman & Deans, 2000), bet novēro sinerģismu, lietojot kopā ar karvakrolu (Ultee et al., 2002).

Terpinēns. γ -terpinēns neietekmēja *S. enterica* serovarianta Typhimurium augšanu, taču α -terpinēns inhibēja 11 no 25 baktēriju sugām (Dorman & Deans, 2000)

Ēterisko eļļu antibakteriālā darbība ir plaša spektra, ir vērsta gan uz Gram pozitīvajām, gan uz Gram negatīvajām baktērijām, taču efektivitāte atšķiras. Vairumā gadījumu ēteriskās eļļas ir efektīvākas pret Gram pozitīvajām baktērijām, taču ne vienmēr. Domājams, ka Gram negatīvās baktērijas ir izturīgākas, pateicoties ārējai membrānai, kas ierobežo hidrofobo savienojumu difūziju caur liposaharīdu pārklājumu. Turklāt jāņem vērā, ka ēteriskās eļļas sastāvs, atkarībā no auga sugas un ģeogrāfiskās izcelsmes, var atšķirties, un tas var izraisīt atšķirības Gram pozitīvo un Gram negatīvo baktēriju jutības pakāpēs (Burt, 2004).

Ēteriskās eļļas raksturīgo aktivitāti nosaka ne tikai sastāvā esošo komponentu ķīmiskā konfigurācija un procentuālais daudzums, bet arī to savstarpējā mijiedarbība. Papildinošs jeb aditīvs darbības efekts tiek novērots, ja kombinēto komponentu darbības efekts ir vienāds ar to individuālo komponentu darbības efektu summu. Antagonisms tiek novērots, kad kombinēto savienojumu iedarbība ir mazāka, nekā ja tie tiek piemēroti atsevišķi. Savukārt sinerģisms tiek novērots, kad komponentu maisījuma aktivitāte ir lielāka par atsevišķo komponentu iedarbības summu. Līdzšinējie pētījumi pierāda, ka ēteriskām eļļām nereti ir novērota augstāka antibakteriālā darbība nekā galvenajiem tās komponentiem, kas liecina par mazākumā esošu komponentu būtisko ietekmi un savstarpēju sinerģiskumu (Burt, 2004). Kā minēts iepriekš, sinerģisms starp p-cimēnu un karvakrolu ir pierādīts. p-cimēns ietekmē baktēriju šūnas membrānas uzbriešanu lielākā mērā kā karvakrols, tādējādi tas sekmē karvakrola transportēšanu baktēriju šūnā (Bassolé & Juliani, 2012; Ultee et al., 2002)

Pētījumos ir pierādīts, ka terpenoīdi ar zemāku molekulmasu un polāro funkcionālo grupu uzrāda vislabāko aktivitāti gan MIC, gan laika nogaidīšanas (*time-kill*) testos. Šādas īpašības atvieglo vielu iekļūšanu caur ārējo šūnas membrānu un palielina antibakteriālo efektivitāti (Guimarães et al., 2019). Pēc darbības ātruma ēteriskās eļļas un to komponentus var iedalīt divās grupās – ātras un lēnas iedarbības savienojumi. Ir ziņots, ka karvakrols, timols, geraniols un kanēļaldehīds noteiktos apstākļos inaktivē *E. coli* piecās minūtēs, bet savienojumiem, kas darbojas lēni – ir vajadzīgas 30-60 min (Guimarães et al., 2019).

Par ēterisko eļļu izmantošanas trūkumiem visbiežāk uzskata augstās izmaksas, nereti nepieciešamas augstas koncentrācijas, lai panāktu bakteriostatisku vai bakteriocīdu darbību. Lai arī tām ir augsts potenciāls izmantot tās kā antibiotiku alternatīvu arī cūku barībā, kā ierobežojošo faktoru var minēt nepieciešamās augstās mic vērtības, kuras savukār var izraisīt samazinātu barības uzņemšanu (Omonijo et al., 2018). Tiek minēta arī nekonsekvenču darbības ziņā – ēteriskās eļļas sastāvā ietilpstošie komponenti var darboties savstarpēji sinerģiski un arī antagoniski (Cho et al., 2020).

Literatūras apskata kopsavilkums

Escherichia coli ir komensiāla zarnu trakta baktērija, taču daži tās celmi ir patogēni, ko nodrošina virulences gēnu klātbūtne, kas kodēti baktērijas hromosomā vai plazmīdās. Pateicoties virulences gēnu spējai izplatīties starp *E. coli* celmiem horizontālās gēnu pārnesei ceļā, tiek sekmēta patogēno celmu izplatība zarnu traktā un vidē (C. Tan et al., 2012). Patogēnie celmi aktuāli ir jaundzīvnikiem – zīdēj- un atšķirtiemi sīvēniem, īpaši, klātesot predisponējošiem faktoriem – higiēnas nepilnībām, ēdināšanas kļūdām, samazinātai imunitātei un stresa apstākļiem. Patogēnie *E. coli* celmi kolonizē zarnu traktu un izraisa vienu no nozīmīgākajām cūku infekcijas slimībām – kolibakteriozi, kas, atkarībā no virulences faktoru klātbūtnes un uzņēmīgā jaundzīvnieka vecuma, rada kādu no kolibakteriozes formām – jaundzimušo sīvēnu diareju, pirms-, pēcātšķiršanas diareju vai tūskas slimību (Gyles & Fairbrother, 2010). Tā kā kolibakteriozes uzliesmojumi parasti skar lielu ganāmpulka daļu, tā rada ievērojamus ekonomiskos zaudējumus mirstības vai samazināta svara pieauguma un ārstēšanas dēļ (Fairbrother & Nadeau, 2019).

Būtiska nozīme kolibakteriozes kontrolē ir profilaksei. Antibiotikām kā sīvēnu saslimšanas profilaktiskajiem līdzekļiem un augšanas veicinātājiem ir bijusi būtiska nozīme cūkkopības nozares attīstībā vairāk nekā 50 gadus. Nevar noliegt antibiotiku pozitīvo efektu uz zarnu bakteriālo infekciju kontroli (Cromwell, 2002), taču no otras puses, antibiotiku pārlietu plaša un nereti arī nepareiza lietošana ir rezultējusies ar rezistentu baktēriju, tostarp *E. coli* selekciju. Turklāt, tā kā *E. coli* rezistenci kodējošie gēni galvenokārt lokalizējas mobīlajos ģenētiskajos elementos, piemēram, plazmīdās, tie var izplatīties horizontālās gēnu pārnesei ceļā, izmantojot kādu no rekombinācijas mehānismiem, turklāt rezistences gēni var tikt nodoti patogēniem, kas padara antimikrobiālās rezistences problēmu īpaši satraucošu, radot draudus ne tikai dzīvniekiem, bet arī sabiedrības veselībai (Boerlin & White, 2013).

Nemot vērā rezistentu baktēriju globālo izplatību un radītos draudus sabiedrības veselībai, jau kopš 2006. gada ES ir aizliegts lietot antibiotikas kā augšanas veicinātājus dzīvnieku, tostarp cūku barībā. Turklāt antibiotiku rezistences draudu nopietnība ir mudinājusi daudzas Pasaules un ES valstis uzsākt rezistences uzraudzības programmas, lai novērtētu problēmas apmērus, sekotu tās attīstībai laika gaitā un novērtētu kontroles pasākumu efektivitāti. Neskatoties uz to, ka antibiotikas kā augšanas veicinātājus cūku barībā ir aizliegts lietot jau vairāk nekā 15 gadus, līdzšinējie antimikrobiālās rezistences dati liecina par rezistences augsto izplatību Pasaules un ES valstīs, kā arī par paplašināta spektra bēta-laktamāzes producējošā *E. coli* sastopamības dramatisko pieaugumu nobarojamajām cūkām (Bergšpica et al., 2020; EFSA & ECDC, 2020). Arī Latvijā ir veikts indikatorbaktērijas *E. coli* rezistences monitorings nobarojamajām cūkām kautuvēs, taču, lai efektīvāk izstrādātu rezistences izplatības ierobežošanas un samazināšanas pasākumus, ir nepieciešams iegūt indikatora baktērijas *E. coli* rezistences izplatību dažāda vecuma cūkām Latvijā, kā arī ir jāpievērš uzmanība rezistences izplatībai atšķirīgas ražošanas intensitātes (lielajās un mazajās) cūkkopības saimniecībās.

Cūkkopības saimniecības ir milzīga izaicinājuma priekšā – no vienas puses ir jānodrošina efektīva zarnu infekciju, tostarp *E. coli* izraisīto diareju kontrole sīvēniem, no otras puses – maksimāli jāizvairās no antibiotiku lietošanas nepieciešamības. Līdzšinējie pētījumi liecina, ka to ir iespējams sasniegt ar efektīvām diētas stratēģijām, kas samazina *E. coli* kolonizāciju zarnu traktā, sekmē sīvēnu zarnu veselību un imunoloģisko nobriešanu (Stein & Kil, 2006). Antibiotiku lietošanas aizliegums slimību profilaksē ir sekmējis alternatīvo līdzekļu izstrādi, tostarp uzmanība ir pievērsta probiotikām un fitogēniem līdzekļiem. Līdzšinējie pētījumi apstiprina probiotiku un augu izcelsmes līdzekļu spēju samazināt patogēno baktēriju kolonizāciju cūku zarnu traktā, to piesaisti zarnu gļotādai, kā arī uzlabot zarnu mikrobiotu, turklāt fitogēnas izcelsmes līdzekļi īpaši raksturojas ar plašu darbības spektru – ir pierādītas to antimikrobiālās, pretiekaisuma, antioksidatīvās un imūnmodulējošās īpašības (X. Liu et al., 2018).

Neskatoties uz to, ka ir pieejami neskaitāmi pētījumi par probiotiku un dažādu fitogēno komponentu pozitīvo iedarbību uz sīvēnu zarnu veselības rādītājiem, joprojām trūkst efektīvu barības piedevu, kuru darbība būtu pierādīta kompleksos pētījumos – pievēršot uzmanību to ietekmei gan uz zarnu mikrobiotu, zarnu veselību, imunoloģisko nobriešanu, gan arī pievērsta uzmanību to ietekmei uz mikrobiotas rezistentajiem pārstāvjiem, piemēram, rezistentās indikatorbaktērijas *E. coli* izplatību.

Pēdējos gados aizvien pieaug interese par ēterisko eļļu izmantošanu cūkkopībā kā antibiotiku alternatīvu, pateicoties to bagātīgajam aktīvo vielu saturam un plašam darbības spektram. Īpaši augsts potenciāls ir ēteriskajām eļļām, kuras raksturojas ar baktericīdu darbību – kurās ir augstā koncentrācijā skābekli saturoši monoterpēni un aromātiskie monoterpenoīdi (fenoli). Turklāt, ņemot vērā, ka ēteriskās eļļas ir aktīvo vielu maisījumi, antibakteriālā darbība uz baktēriju šūnas struktūru ir vērsta kompleksi, palielinot tās efektivitāti (Burt, 2004). Taču, neskatoties uz minētajām pozitīvajām īpašībām, ēterisko eļļu MIC vērtības, kas nepieciešamas zarnu patogēnu iznīcināšanai, ir pietiekami augstas, tādējādi var nenodrošināt optimālu barības uzņemšanu, arī ēterisko eļļu izmaksas varētu būt pārāk augstas, tāpēc kā daudzsološs risinājums varētu būt ēterisko eļļu lietošana kombinācijās ar citiem dabiskas izcelsmes nekaitīgiem līdzekļiem (Omonijo et al., 2018). Turklāt, ēterisko eļļu lietošana kopā ar citiem lētākiem un vienlaikus nekaitīgiem dabiskiem līdzekļiem varētu sekmēt to plašāku izmantošanu, piemēram, kā vides apstrādes līdzekļos.

Lai arī līdzšinējos pētījumos ir pierādīta ēterisko eļļu augstā efektivitāte pret dažādiem patogēniem, arī novērota augsta to efektivitāte pret antibiotikām rezistentām baktērijām, joprojām zinātnes telpā trūkst salīdzinošu datu par tās pašas ēteriskās eļļas iedarbības efektivitāti pret dažāda rezistences līmeņa baktērijām. Ņemot vērā ēterisko eļļu salīdzinoši augstās izmaksas, ir svarīgi izvērtēt ēterisko eļļu darbīgās koncentrācijas samazināšanas iespējas, lietojot tās kombinācijā ar dažādiem dabiskas izcelsmes līdzekļiem, kā piemēram kaprilskābi vai nātrija hlorīdu. Lai arī ēterisko eļļu antibakteriālā darbība ir plaši pētīta pasaulē, Latvijā tādi pētījumi līdz šim nav veikti. Ir pētīta mazā mērsila (*Thymus serpyllum*) ēteriskās eļļas sastāvs, taču ne antibakteriālā darbība, turklāt būtiski būtu veikt antibakteriālās darbības salīdzināšanu ar Dienvidēiropas izcelsmes ēteriskajām eļļām, kas plaši pieejamas komerciālajā tirgū. Iegūtie rezultāti ļautu izvērtēt ēterisko eļļu izmantošanas iespējas rezistentā *E. coli* izplatības samazināšanai cūkkopības saimniecībās un apsvērt iespēju kā potenciālu aktīvās vielas komponentu vides apstrādes līdzekļos.

2. MATERIĀLS UN METODIKA

2.1. Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma

Promocijas pētījums izstrādāts trijās aktivitātēs laika posmā no 2014. līdz 2022. gadam – LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūtā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

Lai noteiktu pret antibiotikām rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* izplatību cūkām, Pirmajā pētījuma aktivitātē ieguvām cūku fekāliju paraugus septiņās saimniecībās trīs Latvijas reģionos – Vidzemes, Pierīgas un Zemgales. Paraugu bakterioloģisko un molekulārbioloģisko izmeklēšanu veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā (LLU BZL MBMN).

Lai izvērtētu rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanas iespējas cūkkopības saimniecībās, tika realizētas vēl divas aktivitātes – sivēnu ēdināšanas pētījums (Otrā aktivitāte) un aktīvo vielu komponentu izstrāde potenciāliem vides apstrādes līdzekļiem (Trešā aktivitāte).

Otrajā pētījuma aktivitātē, vienā cūkkopības saimniecībā Pierīgas reģionā, realizējām sivēnu ēdināšanas pētījumu. Sivēniem izēdinājām trīs dažādus dabiskas izcelsmes barības komponentus – probiotikas saturošu papildbarību “ProbioHelp” (turpmāk tekstā – probiotikas), probiotikas+griķu klijas un augu piedevu. Aktivitātes laikā iegūtajos asins paraugos noteicām hematoloģiskos un bioķīmiskos rādītājus LLU Veterinārās klīnikas laboratorijā. Sivēnu fekāliju un gremošanas satura paraugu bakterioloģisko izmeklēšanu veicām LLU BZL MBMN. Audu histoloģiskie preparāti tika sagatavoti LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā, bet audu imūnhistoķīmiskie preparāti tika sagatavoti Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centrā. Histoloģisko preparātu histopatoloģiskā izvērtēšana tika veikta Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR” Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā. Audu griezumumu histomorfoloģiskos mērījumus un imūnhistoķīmisko griezumumu izvērtēšanu veicām LLU BZL MBMN. Taukskābju saturs cūku muskulatūrā noteikts zinātniskajā institūtā “BIOR” Ķīmijas laboratorijā.

Trešajā pētījuma aktivitātē ieguvām savvaļā augušu un Latvijā audzēto augu ēteriskās eļļas Latvijas Valsts Mežzinātnes institūta “Silava” Meža izejvielu pārstrādes laboratorijā, savukārt augu ēterisko eļļu ķīmiskais sastāvs tika noteikts LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Agronomisko analīžu nodaļā. Komerciālo un pašu autoru iegūto ēterisko eļļu un bagātināto komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaudi veicām LLU BZL MBMN.

Pētījuma aktivitāšu raksturojums.

Pirmās pētījuma aktivitātes laikā no 2015. gada līdz 2018. gadam ieguvām 615 cūku fekāliju paraugus no četriem (n=110) un sešiem (n=151) nedēļu veciem sivēniem, astoņiem (n=105) un 12 (n=87) nedēļu vecām jauncūkām, 20 nedēļu vecām nobarojamajām cūkām (n=85) un sivēnmātēm (n=77). Paraugi tika iegūti septiņās cūkkopības saimniecībās, no kurām četras tika uzskatītas kā lielas (L1, L2, L3 un L4; n=465) un trīs kā mazas (S1, S2 un S3; n=150). Iegūstot cūku fekāliju paraugus saimniecībās, tika veikta saimniecību īpašnieku vai apkalpojošo veterinārārstu anketēšana ar mērķi iegūt informāciju saimniecību raksturošanai, noskaidrotu veikto profilaktiskos pasākumus un visbiežāk lietotās antibiotikas cūku ārstēšanā. Cūku fekāliju paraugus izmeklējām bakterioloģiski – izolējām komensiālo indikatorbaktēriju *E. coli* (n=615), noteicām tās jutību pret 12 antibiotikām un izvērtējām piederību multirezistentās (MDR) baktērijas statusam, lai spriestu par antibiotiku rezistentu baktēriju izplatību cūku populācijā. Visi iegūtie cūku fekāliju paraugi (n=615) tika testēti uz paplašinātā spektra bēta-laktamāzes (ESBL) producējošā *E. coli* klātbūtni. Aizdomīgajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=144) veicām fenotipisko apstiprināšanu un, izmantojot stratificētās nejaušības paraugu atlases metodi, atlasījām 50 ESBL *E. coli* izolātus, lai, izmantojot molekulāri-bioloģiskās metodes, noteiktu ESBL kodējošo gēnu *bla* (TEM, SHV, CTX-M) klātbūtni.

Molekulāri-bioloģiski apstiprinātajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=50) noteicām jutību pret 18 antibiotikām un analizējām asociācijas starp ESBL kodējošajiem gēniem un fenotipiski konstatēto rezistenci.

Otrās pētījuma aktivitātes laikā no 2015. gada jūlijam līdz 2017. gada jūlijam veicām trīs dabiskas izcelsmes barības komponentu (probiotiku, probiotiku+griķu kliju un ārstniecības augu) iegādi/sagatavošanu (kas uzrādītu antibiotikām līdzvērtīgus pozitīvos efektus un ļautu aizvītot antimikrobiālos līdzekļus barības devā sivēniem) un sekojošu to izēdināšanu sivēniem no 14. līdz 56. dzīves dienai. Pētījuma laikā izvērtējām barības komponentu (probiotiku, probiotiku+griķu kliju un ārstniecības augu) spēju modulēt zarnu mikrobiotu, ietekmēt rezistentā *E. coli* izplatību, novērtējām to ietekmi uz sivēnu vispārējo veselības stāvokli un zarnu veselību – zarnu histomorfoloģisko un imunoloģisko stāvokli, kā arī pievērsām uzmanību gaļas kvalitātei pēc taukskābju satura muskuļaudos.

Sivēnu ēdināšanas pētījuma laikā tika iegūti asins paraugi (n=50) sivēnu 14. un 56. dzīves dienā, veikta to hematoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana.

Bakterioloģiski izmeklējām fekāliju, rektālos un gremošanas satura paraugus. Iegūtajos fekāliju paraugos (sivēnu dzīves 14., 35. un 56. dienā; n=93) noteicām *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaitu log kvv g⁻¹. Iegūtajos rektālajos paraugos (14. un 56. sivēnu dzīves dienā, n=46) izolējām *E. coli* (n=80) un noteicām tā rezistenci pret 12 antibiotikām. Savukārt zarnu (*jejunum* un *colon*) gremošanas satura paraugos (56. sivēnu dzīves diena; n=28) noteicām *E. coli*, *Enterobacteriaceae* un *Lactobacillus* spp. skaitu log kvv g⁻¹.

Zarnu (*jejunum* un *colon*) audu (56. sivēnu dzīves diena, n=28) griezumā (n=280) tika izmeklēti histoloģiski (n=168) un imūnhistoķīmiski (n=112). Tika izvērtēts zarnu histopatoloģiskais stāvoklis, iegūti zarnu histomorfoloģiskie mērījumi – kriptu dziļums (CD), bārkstiņu augstums (VH), bārkstiņu platums (VW), bārkstiņu augstuma un kriptu dziļuma attiecība VH:CD, kausveida šūnu (GC) skaits un blīvums, neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošu kausveida šūnu skaits un blīvums. Imūnhistoķīmiski noteicām Ki67 un CD3 pozitīvo šūnu skaitu un relatīvo biežumu dažādās tievās un resnās zarnas struktūrās. Lai izvērtētu gaļas kvalitāti pēc nepiesātināto un piesātināto taukskābju satura, tika noteikts taukskābju saturs gaļas paraugos (n=8), izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi. Sivēnu ēdināšanas un paraugu iegūšanas aktivitātēm likumdošanas regulējums sniegts 1. pielikumā.

Lai sekmētu rezistentā *E. coli* samazināšanas iespējas cūkkopības saimniecību vidē, izmantojot augu izcelsmes līdzekļus, Trešās pētījuma aktivitātes laikā no 2018. gada līdz 2022. gadam, veicām aktīvo vielu komponentu izstrādi potenciāliem vides apstrādes līdzekļiem. Ar hidrodestilācijas metodi ieguvām augu ēteriskās eļļas (n=3) no Latvijā augušiem ārstniecības augiem, kā arī iegādājāmies komerciāli pieejamos analogus (n=3). Sekojoši noteicām ēterisko eļļu (n=6) ķīmisko sastāvu, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi un noteicām antibakteriālo aktivitāti un savstarpēji salīdzinājām darbības efektivitāti mūsu iegūtajām ēteriskajām eļļām un komerciāli pieejamiem analogiem *in vitro* pret dažāda rezistences līmeņa ESBL producējošiem *E. coli*, kas izolēti no cūku fekālijām Pirmās pētījuma aktivitātes laikā. Noteicām un salīdzinājām komerciālo un bagātināto (ar kaprīlskābi, NaCl) komerciālo ēterisko eļļu antibakteriālo darbību, kas sekmētu šo dabiskās izcelsmes līdzekļu praktisko izmantošanu *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanai cūkkopības industrija. Kopējo pētījuma shēmu skatīt 2.1. attēlā.

I aktivitāte: rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* izplatības noteikšana cūku saimniecībās

Cūku saimniecību (n=7) īpašnieku/veterinārārstu anketēšana

Cūku **fekāliju** paraugu (n=615) **bakterioloģiskā izmeklēšana**:

- *E. coli* **izolēšana** (n=615) un to **rezistences** (jutības) **noteikšana** pret 12 AB līdzekļiem
- **ESBL producējošā *E. coli* klātbūtnes noteikšana** fekāliju paraugos (n=615) **fenotipiskā apstiprināšana** (n=144) un to (n=50) **rezistences** (jutības) **noteikšana** pret 18 AB līdzekļiem

Molekulāriobioloģiskā izmeklēšana: ESBL producējošo gēnu (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}) **noteikšana** fenotipiski apstiprinātajiem ESBL producējošiem *E. coli* (n=50)

Rezistentā un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanas iespējas

II aktivitāte: Sivēnu ēdināšanas pētījums

Probiotiku (P), probiotiku + griķu kliju (PB) un augu (H) barības komponentu izēdināšana sivēniem: P, PB, H un C (kontroles) grupas, (n=44)

Asins paraugu (14. un 56. sivēnu dzīves diena, n=50) **hematoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana**

Bakterioloģiskā izmeklēšana:

- **fekāliju** paraugos (14., 35. un 56. sivēnu dzīves diena, n=93) tika noteikts *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaits
- **rektālajos** paraugos (14. un 56. sivēnu dzīves diena, n=46) **izolēti *E. coli*** (n=80), noteikta to rezistence (jutība) pret 12 AB
- **zarnu (*jejunum* un *colon*) gremošanas satura** paraugos (56. sivēnu dzīves diena, n=28) noteikts *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus spp.* skaits

Zarnu (*jejunum* un *colon*) audu (56. sivēnu dzīves diena, n=28) **histoloģiskā** (n=168 griezumī) **izmeklēšana**:

- zarnu **histopatoloģiskā stāvokļa** novērtējums (n=56)
- zarnu **histomorfoloģisko rādītāju mērījumi** (CD, VH, VW, CD:VH, GC skaits un blīvums (n=56)
- **neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošu** kausveida šūnu skaita un blīvuma **noteikšana** (n=112)

Zarnu (*jejunum* un *colon*) imūnhistokīmiskā (n=112 griezumī) **izmeklēšana**:

Ki67 un CD3 pozitīvo šūnu noteikšana (IEL, LP, PP)

Taukskābju satura noteikšana **muskuļaudu** paraugos, izmantojot **gāzu hromatogrāfijas** metodi (56. sivēnu dzīves diena, n=8)

III aktivitāte: aktīvo vielu komponentu izstrāde potenciāliem vides apstrādes līdzekļiem

Augu ēterisko eļļu (EO) ieguve ar **hidrodestilācijas** metodi (n=3)

EO (LV un komerciālo, n=6) ķīmiskā sastāva noteikšana, izmantojot **gāzu hromatogrāfijas** metodi

EO (n=6) antibakteriālās aktivitātes (MIC, MBC) noteikšana **bakterioloģiski** pret cūku komensālajiem *E. coli* un ESBL producējošiem *E. coli* (n=10)

Aktīvo vielu komponentu izstrāde:

- komerc. EO+3% NaCl
- komerc. EO+1mM kaprīlskābe

un to **antibakteriālās aktivitātes** (MIC, MBC) noteikšana **bakterioloģiski** pret cūku komensālajiem *E. coli* un ESBL producējošiem *E. coli* (n=10)

2.1. att. Pētījuma shēma

2.2. Materiāla raksturojums

2.2.1. Cūkkopības saimniecību raksturojums.

Lai noskaidrotu pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību cūkām, **Pirmās pētījuma aktivitātes** laikā apsekojām septiņas cūkkopības saimniecības, t.i., četras nosacīti lielās (sivēnmāšu skaits saimniecībā ir robežās no 700-2100) un trīs nosacīti mazās (sivēnmāšu skaits 15-40) saimniecības.

Pirms paraugu ieguves, aptaujas veidā tika iegūta informācija par saimniecības lielumu, raksturojumu, kā arī diarejas aktualitāti sivēniem, ārstēšanu un profilaksi. Aptaujā tika formulēti vairāki jautājumi.

1. Kāds ir kopējais cūku skaits saimniecībā, sivēnmāšu skaits, dominējošās cūku šķirnes, to krastojumi?
2. Kāds ir saimniecības ražošanas cikla veids (noslēgts, dalīts)?
3. Kādā vecumā sivēnus atšķir no sivēnmātēm?
4. Kādas tiek izmantotas barības piedevas sivēnu atšķiršanas laikā (cinka oksīds, probiotikas, prebiotikas, antimikrobiālie preparāti)?
5. Vai pastāv diarejas aktualitāte sivēniem (ir/nav, raksturīgākie vecuma posmi), vai ir zināmi iespējamie diarejas ierosinātāji?
6. Kādi ir biežāk ārstēšanā lietotie antimikrobiālie preparāti?

Tādējādi no septiņām saimniecībām kopā ieguvām 615 fekāliju paraugus.

2.2.2. Sivēnu barības komponentu raksturojums

Lai izvērtētu dažādu dabiskas izcelsmes barības komponentu – probiotikas saturošas papildbarības un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu ietekmi uz zarnu mikrobiotas modulāciju, rezistentā *E. coli* izplatību, cūku un to zarnu veselību, **Otrās pētījuma aktivitātes** (sivēnu ēdināšanas pētījuma) realizēšanai izmantojām sekojošas barības sastāvdaļas:

- 1) *augu piedeva* – atļautu augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļa – pulverveida viela, ko sagatavojām no 2015. gada jūlijā ievāktiem ārstniecības augiem (lielās ceļtekas (*Plantago major* L.), lielās nātres (*Urtica dioica* L.) un divšķautņu asinszāles (*Hypericum perforatum* L.)) lakstiem, attiecībā 1:1:1 (turpmāk tekstā – augu piedeva). Augus ievācām Dobeles (56°41'27.9" N 23°17'20.7" E), un Līvānu novadā (56°22'12.5" N 26°13'44.8" E), sausā, saulainā laikā pēc rasas nožūšanas ziedēšanas sākumfāzē vai ziedēšanas laikā. Augu lakstus žāvējām siltā, noēnotā un labi vēdinātā telpā. Izkaltētās drogas iepakojām papīra maisos, marķējām ar nosaukumiem un ieguves datumiem un uzglabājām sausā, tumšā vietā. Nedēļu pirms pētījuma uzsākšanas sagatavojām augu piedevu. Katru ārstniecības augu drogu sasmalcinājām līdz 1-2 cm lielos gabalos un sekojoši samalām ar dzirnavām līdz pulverveida masai. Augu piedeva saturēja *Plantago major*, *Urtica dioica* un *Hypericum perforatum* – izcelsmes sastāvdaļas attiecībā 1:1:1.
- 2) *griķu klijas* – augu izcelsmes barības sastāvdaļa, kas izgatavota no griķiem (*Fagopyrum esculentum* L.). Griķu klijas iegādājāmies no komerciālā ražotāja (Z/s "Bebri"), kas ir bioloģiski sertificēta saimniecība (turpmāk tekstā – griķu klijas).
- 3) *probiotikas*. Kā probiotiskas izmantojām komerciāli pieejamo probiotikas saturošu papildbarību "ProbioHelp" (turpmāk tekstā – probiotikas). Probiotiku daudzums 1mL ir: *Bacillus subtilis* ATCC PTA 6737 – $7.42 \cdot 10^4$ kvv; *Bacillus subtilis* DSM 15544 – $2.2 \cdot 10^6$ kvv; *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc47 – $7.0 \cdot 10^3$ kvv; *Lactobacillus casei* ATCC7469 – $6.0 \cdot 10^3$ kvv; *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3235 – $2.0 \cdot 10^5$ kvv; *Lactococcus lactis* NCIMB 30117 – $4.0 \cdot 10^5$ kvv; *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203 – $7.0 \cdot 10^3$ kvv.

Sivēnu ēdināšanas aktivitātēm likumdošanas regulējums sniegts 1. pielikumā.

2.2.3. Ēdināšanas pētījuma sivēnu grupu raksturojums

Sivēnu ēdināšanas pētījums (**Otrā pētījuma aktivitāte**) tika realizēts vienā cūkkopības saimniecībā – L3, kur tika veikta probiotiku un atļautu augu izcelsmes barības sastāvdaļu izēdināšana sivēniem. Pētījumam atlasījām četrus metienus, kuros bija sivēnmātes ar 14 dienu veciem Landrases un Djurokas šķirnes krustojuma sivēniem (n=44), ar vidējo dzīvmasu 4.96 ± 0.13 kg. Katra metiena sivēnus tālāk iedalījām pētnieciskajās grupās – t.i., kontroles grupa (C grupa, n=11), probiotiku grupa (P grupa, n=11), probiotiku un griķu kliju grupa (PB grupa, n=11) un ārstniecības augu grupa (H grupa, n=11). Pētījuma laikā pie dzeramā ūdens P un PB grupai pievienojām probiotikas noteiktā koncentrācijā, savukārt, PB grupai vēl papildus pie pamatbarības noteiktā koncentrācijā pievienojām klāt griķu klijas. H grupai pie pamatbarības pievienojām augu piedevu noteiktā koncentrācijā. Pētījuma periods bija 6 nedēļas, t.i., no 14. līdz 56. sivēnu dzīves dienai. Sivēnu ēdināšanas pētījuma gaita aprakstīta 2.3.2. apakšnodaļā.

Sivēnu ēdināšanas un paraugu iegūšanas aktivitātēm likumdošanas regulējums sniegts 1. pielikumā.

2.2.4. Ēterisko eļļu raksturojums

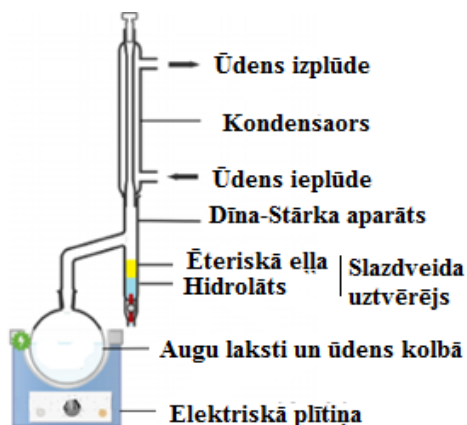
Lai izvērtētu rezistentā *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* samazināšanas iespējas, izmantojot augu izcelsmes līdzekļus – ēteriskās eļļas, **Trešās pētījuma aktivitātes laikā ieguvām** Latvijā augušu augu un komerciālajā tirgū pieejamas ēteriskās eļļas.

Latvijā iegūto ēterisko eļļu raksturojums. Lai iegūtu ēteriskās eļļas no Latvijā augušiem ārstniecības augiem, 2019. gada jūlijā ievācām mazā mārsla (*Thymus serpyllum* L.), parastā timiāna (*Thymus vulgaris* L.) un kalnu pupumētras (*Satureja montana* L.) lakstus. Mazo mārslu ievācām no savvaļā augošajiem augiem Jelgavas ($56^{\circ}39'45.4''$ N $23^{\circ}45'13.9''$ E) un Salaspils ($56^{\circ}52'11.4''$ N $24^{\circ}21'04.5''$ E) apkārtnē. Parastā timiāna un kalnu pupumētras lakstus ievācām no sertificētas bioloģiskās saimniecības Krāslavas apkārtnē ($55^{\circ}53'50.5''$ N $27^{\circ}05'55.6''$ E). Visus ārstniecības augu lakstus ievācām pilnziejā, sausā un saulainā laikā, uzglabājām $+4^{\circ}\text{C}$ un izmantojām ēteriskās eļļas ieguvei 24-48 h laikā.

Augu ēteriskās eļļas ieguvām ar hidrodestilācijas metodi Latvijas Valsts Mežzinātnes institūtā “Silava”, Meža izejvielu pārstrādes laboratorijā, izmantojot Dīna-Stārka destilācijas aparātu (Suresh et al., 2021) (2.2. attēls). Auga lakstus sasmalcinājām 1-1.5 cm lielos gabalos. Sasmalcinātās augu daļas ienesām apaļkolbā un pievienojām karstu ūdeni, augu un ūdens svara attiecība bija 1:3. Sekojoši apaļkolbu ar visu tās saturu karsējām uz sildvirsmas līdz vārīšanas temperatūrai. Viena cikla destilācijas ilgums – 1.5-2.5 h. Lai izvairītos no siltuma zudumiem un straujām temperatūras maiņām, apaļkolbu ietinām alumīnija folijā. Destilācijas procesā ēteriskā eļļa un hidrolāts uzkrājas Dīna-Stārka aparāta slazdveida uztvērējā, un, tā kā ēteriskajām eļļām ir mazāks blīvums nekā hidrolātam, tās nostājas augšpusē, un to atdalījām ar dalāmās piltuves palīdzību. Ēteriskās eļļas iepildījām 2 mL ependorfa stobriņos un uzglabājām -18°C , tumšā vietā.

Komerčiālo ēterisko eļļu iegāde. Iegādājāmies trīs komerciālās ēteriskās eļļas:

- 1) mazais mārsls (*Thymus serpyllum* L.), ražotājs “Primavera” (Vācija), izcelsmes valsts – Turcija;
- 2) parastais timiāns (*Thymus vulgaris* L.), ražotājs “Oils4life” (Apvienotā Karaliste) izcelsmes valsts – Spānija;
- 3) kalnu pupumētra (*Satureja montana* L.), izplatītājs “Hermitage Oils”, izcelsmes valsts – Horvācija.



2.2. att. Ēterisko eļļu ieguve ar hidrodestilācijas metodi, izmantojot Dīna-Stārka destilācijas aparātu

Avoti: foto – D. Gāliņa, shematiskais zīmējums – Suresh et al., 2021

Saskaņā ar izplatītāja sniegto informāciju, tās ir iegūtas ar tvaika destilācijas metodi un tiek definēts kā 100% tīras un dabīgas ēteriskās eļļas.

2.3. Metodikas apraksts

2.3.1. Cūku fekāliju paraugu ieguve Latvijas cūkkopības saimniecībās

Pirmās pētījuma aktivitātes laikā no septiņām cūkkopības saimniecībām kopumā ieguvām 615 fekāliju paraugus. Fekāliju paraugus ($n=615$) ieguvām no 4 ($n=110$), 6 ($n=151$), 8 ($n=105$), 12 ($n=87$), 20 ($n=85$) nedēļu vecām cūkām un sivēnmātēm ($n=77$) pēc nejaušības principa, atlasot divus līdz četrus paraugus no cūku sprosta, atkarībā no apstākļiem, t.i., tūlīt pēc defekācijas vai izvēloties pēc iespējas svaigākas fekāliju masas no sprosta grīdas. Fekāliju paraugi ($n=615$) tika transportēti sterilos Whirl-Pack maisiņos un uzglabāti 2-8 °C, līdz uzsākta bakterioloģiskā paraugu izmeklēšana 24 h laikā. Paraugos tika veikta *E. coli* izolēšana un ESBL producējošā *E. coli* klātbūtnes noteikšana, kā arī sekojoša to jutības noteikšana pret antibiotikām. ESBL producējošiem *E. coli* tika noteikta ESBL kodējošo gēnu klātbūtne.

Iegūto paraugu izmeklēšanai pielietoto metodiku skatīt 2.3.3. (Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana) un 2.3.4. (ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes) apakšnodaļās.

2.3.2. Sivēnu ēdināšanas pētījums un paraugu ieguves metodika

Otrās pētījuma aktivitātes laikā, saimniecībā L3, tika veikta probiotiku un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļu izēdināšana sivēniem. Pētījuma laikā tika iegūti sivēnu asins ($n=50$), fekāliju ($n=93$), rektālie ($n=46$), gremošanas satura ($n=28$), zarnu audu ($n=28$) un muskuļaudu paraugi ($n=8$).

Barības komponentu izēdināšana sivēniem, pētījuma gaita.

Barības komponentu izēdināšanas pētījums ilga 6 nedēļas – no sivēnu 14. līdz 56. dzīves dienai. Līdz sivēnu 28. dzīves dienai (atšķiršanai), katras pētnieciskās grupas sivēni tika turēti kopā ar sivēnmāti atnešanās sprostā. Visas sivēnu grupas turētas vienādos apstākļos (vienā istabā/sekcijā), katras grupas sivēnu dzirdināšana tika nodrošināta ar individuālajām nipelītipa dzirdnēm un veikta piebarošana, izmantojot pārvietojamas barotavas. 28 dienu vecumā sivēnus atšķīrām no sivēnmātes un pārvietojām uz atšķirto sivēnu istabu. Pētījumu turpinājām tādās pašās pētījuma grupās vēl četras nedēļas (2.3. attēls), līdz sivēni bija sasnieguši 56 dienu

vecumu. Pēcatšķiršanas periodā visu grupu sivēni tika turēti vienādos apstākļos, blakus esošos aizgaldos, turpinot nodrošināt dzirdināšanu ar individuālajām nipelītipa dzirdnēm, bet barošana nodrošināta, izmantojot pārvietojamas barotavas.

Visās pētījuma grupās kā pamatbarību (no 14.dienas vecuma) sivēni saņēma vecumam un svaram atbilstošu sabalansētu un pašā uzņēmumā ražotu barību "BeBi". Sivēniem, sasniedzot 10 kg dzīvsvaru (tas ir no 35. dzīves dienas), pamatbarība tika nomainīta uz uzņēmumā ražoto sabalansēto barību "Prestarter", bet, sasniedzot 15 kg (tas ir no 49.dzīves dienas) dzīvsvaru, – "Links". Pamatbarības receptūra atbilda sivēnu vecumam un fizioloģiskajām vajadzībām.

Kontroles grupa (C grupa) saņēma pamatbarību atbilstoši vecumam un svaram, un pirmās divas nedēļas pēc atšķiršanas ar 1000 mg ZnO kg⁻¹ piedevu.

Probiotiku grupa (P grupa) saņēma pamatbarību, atbilstoši vecumam un svaram bez piedevām, bet, kopā ar dzeramo ūdeni, tika izdzirdinātas arī probiotikas noteiktā koncentrācijā (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) atbilstoši vecumam (14., 28., 35., 42., 49. dzīves diena).

Probiotiku+griķu kliju grupa (PB grupa) saņēma pamatbarību, atbilstoši vecumam un svaram, kam pievienotas griķu klijas 3% apmērā no pamatbarības masas. Griķu klijas tika vienmērīgi iemaisītas visā barības masā. Kopā ar dzeramo ūdeni tika izdzirdinātas arī probiotikas noteiktā koncentrācijā (1%, 0.75%, 0.45%, 0.34%, 0.32%) atbilstoši vecumam (14., 28., 35., 42., 49.dienas vecumam).

Augu grupa (H grupa) saņēma pamatbarību, atbilstoši vecumam un svaram, ar ārstniecības augu piedevu 1.5% apmērā no pamatbarības masas. Ārstniecības augu piedeva tika vienmērīgi iemaisīta visā barības masā.

Visu pētniecības grupu sivēni barību un ūdeni saņēma *ad libitum*. Neatšķirto sivēnu piebarošanai izmantojām pārvietojamās plastikāta barotavas, bet probiotiku dozēšanai izmantojām medikatoru "Lubing" (Lubing Maschinenfabrik, Vācija).



2.3. att. Sagatavotie aizgaldi sivēnu ēdināšanas pētījuma grupu sivēniem pēcatšķiršanas periodā

(foto: D. Gāliņa)

Asins paraugu iegūšana.

Asins paraugus (n=50) ieguvām no katra dzīvnieka pirmajā (sivēnu 14. dzīves dienā) un pēdējā (56. dzīves dienā) pētījuma dienā. Tie tika iegūti iesaistot saimniecības veterinārārstu un nepārkāpjot labas veterinārās prakses robežas. Iegūstot asins paraugu no vēnas, dzīvniekam netika izraisīts ilgstošs kaitējums; izraisītās sāpes, ciešanas un diskomforts bija līdzvērtīgs adatas ievadīšanai vēnā, atbilstoši labai veterinārmedicīniskajai praksei. Tādējādi, atbilstoši 2013. gadā izdotajiem MK noteikumiem Nr. 52, mūsu veiktās darbības atbilst šo noteikumu Vispārīgo jautājumu 5.6. punktam, kur uzskaitīti gadījumi, uz kuriem šie noteikumi neattiecas, kā rezultātā nebija nepieciešama Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomes atļauja par dzīvnieku izmantošanu pētījumā.

Sivēnus fiksējām mugurģūlā un asins paraugus ieguvām ar vakuumstobriņu, kuram pievienota adata vai arī ar šlirces palīdzību no v. *jugularis externa* vai no v. *brachialis*. Katru asins paraugu ieguvām divos stobriņos – “Vacutest K2 EDTA 5.4mg” un “Vacutest CLOT ACTIVATOR”. Asins paraugus transportējām aukstuma somā (2-8 °C) un 6 h laikā nogādājām Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārās klīnikas laboratorijā, lai veiktu asins hematoloģisko un seruma bioķīmisko analīzi.

Asins paraugu analīzes metodiku un nosakāmos rādītājus skatīt 2.3.7. apakšnodaļā.

Fekāliju un rektālo paraugu iegūšana.

Lai noteiktu barības komponentu ietekmi uz mikrobiotas sastāvu, **fekāliju** paraugus (n=93) iespēju robežās ieguvām no katra sivēna pētījuma uzsākšanas pirmajā dienā (sivēnu 14. dzīves diena, n=13), 35. (n=37). un 56. (n=43) dzīves dienā. Fekālijas ieguvām tūlīt pēc sivēnu izkārnīšanās, tos ievietojam sterilos Whirl-Pack maisiņos. Paraugus transportējām aukstuma somā un sekojoši uzglabājām 2-8 °C, paraugu izmeklēšana uzsākta ne vēlāk kā 48 h laikā. Noteicām *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaitu 1g fekāliju 14., 35. un 56 dienu veciem sivēniem. *E. coli* un *Enterobacteriaceae* skaita noteikšanas metodiku skatīt 2.3.3. apakšnodaļā.

Lai noteiktu barības komponentu ietekmi uz rezistentā *E. coli* izplatību, ieguvām **rektālos paraugus** (n=46) no sivēnu taisnās zarnas ar sterila vates aplikatora palīdzību, sivēnu 14. (n=12) un 56. dzīves dienā (n=34). Paraugus transportējām universālajās AMIES transportbarotnēs, aukstuma somā. Paraugu izmeklēšana (*E. coli* izolēšana un sekojoša tā jutības noteikšana pret antibiotikām) uzsākta nekavējoties pēc nogādāšanas laboratorijā. Paraugu bakterioloģiskās izmeklēšanas gaitas aprakstu skatīt 2.3.3. apakšnodaļā.

Gremošanas satura un zarnu audu paraugi.

Pētījuma beigās (sivēnu 56. dzīves dienā) pēc nejaušības principa izvēlētie četri sivēni no katras pētnieciskās grupas, kā arī divi sivēni no kontroles grupas (n=14) tika nokauti saimnieciskā nolūkā atzītā kautuvē.

Lai noteiktu barības komponentu ietekmi uz gremošanas satura mikrobiotas sastāvu, gremošanas satura paraugus ieguvām no tievās zarnas (*intestinum tenue*) tukšās (*jejunum*) zarnas daļas (20 cm proksimāli no gūžas zarnas un aklās zarnas vēderplēves krokas (*plica ileocaecalis*)) un resnās zarnas (*intestinum crassum*) lokzarnas (*colon*) lejupejošās daļas (*colon descendens*). Gremošanas saturs iegūts 35-50 g apjomā sterilā konteinerā un transportēts aukstuma somā. Paraugi laboratorijā uzglabāti ne ilgāk kā 2 h 2-8 °C līdz uzsākta paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana un noteikts *E. coli*, *Enterobacteriaceae* un *Lactobacillus* spp. skaits. Bakterioloģisko izmeklēšanas metodiku skatīt 2.3.3. apakšnodaļā.

Lai noteiktu barības komponentu ietekmi uz zarnu histomorfoloģisko stāvokli, audu paraugus histoloģiskai izmeklēšanai (1.5-2 cm apjomā) ieguvām no tukšās zarnas (*jejunum*) 20 cm proksimāli no gūžas zarnas un aklās zarnas vēderplēves krokas (*plica ileocaecalis*) un resnās zarnas (*intestinum crassum*) lokzarnas (*colon*) lejupejošās (*colon descendens*) proksimālās daļas. Iegūtie audu paraugi tika noskaloti ar fizioloģisko šķīdumu (0.9% w/v) un fiksēti 10% neitrālā buferētā formalīna šķīdumā. Sivēnu zarnu audu paraugu histoloģisko un imūnhistoķīmisko izmeklēšanas metodiku skatīt 2.3.5. un 2.3.6. apakšnodaļā.

Muskuļaudu paraugu iegūšana.

Lai noteiktu gaļas kvalitātes rādītājus pēc piesātināto un nepiesātināto taukskābju satura muskuļaudos, ieguvām garākā muskuļa jostas un krūšu daļas (*m. Longissimus thoracis et lumborum*) paraugus 200 g apjomā no liemeņa labās un kreisās puses. Paraugus transportējām aukstuma somā un uzglabājām 2-8 °C, paraugi 24 h laikā nogādāti taukskābju satura noteikšanai uz Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātnisko institūtu BIOR. Noteikšanas metodiku skatīt 2.3.8. apakšnodaļā.

2.3.3. Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana

Gan Pirmās pētījuma aktivitātes laikā iegūtajiem cūku fekāliju paraugiem (n=615), gan Otrās aktivitātes laikā iegūtajiem sivēnu rektālajiem (n=46), fekāliju (n=93) un gremošanas satura (n=28) paraugiem veicām bakterioloģisko izmeklēšanu Latvijas Lauksaimniecības universitātes (LLU) Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūta Mikrobioloģijas laboratorijā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

E. coli izolēšana un ESBL producējošā *E. coli* klātbūtnes noteikšana fekāliju paraugos

Lai izolētu *E. coli* no fekāliju (n=615) un rektālajiem (n=46) paraugiem, izmantojām Levina eozīna metilēnzilā agaru (EMB) (Levine EMB Blue Agar, Biolife), bet, lai noteiktu fekāliju (n=615) un sivēnu rektālajos (n=46) paraugos ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni – izmantojām selektīvi diferenciālo barotni – Hromogēno ESBL agaru (ESBL) (Chromart ESBL Agar, Biolife) pēc sekojošas metodikas:

Fekāliju (n=615) parauga testa daļa tika paņemta ar sterilu vates kociņu tieši no laboratorijas parauga vidusdaļas un uzsēta uz EMB agara kvadrantu svītrojuma metodē un uz Hromogēnā ESBL agara nepārtrauktajā svītrojuma metodē. Attiecīgi arī rektālie paraugi (n=46) tika uzsēti uz iepriekšminētajām barotnēm pēc attiecīgajām uzsēšanas metodēm, izmantojot transportbarotnē esošo aplikatoru. Inokulētās plates inkubējām 36 ± 1 °C, 22 ± 2 h. Tumši zilas kolonijas ar zaļganu metālisku spīdumu no EMB agara tika uzskatītas kā *E. coli* aizdomīgas kolonijas. Lielas un rozā kolonijas uz hromogēnā ESBL agara tika uzskatītas kā aizdomīgas ESBL producējošās *E. coli* kolonijas. Ja pēc inkubācijas nenovērojām baktēriju audzi uz hromogēnā ESBL agara, veicām atkārtotu inkubāciju vēl 24 h. Piecas kolonijas no katras pozitīvās EMB un ESBL agara plates pārsējām tālāk uz triptozes sojas agara (Tryptic Soy Agar, Biolife) tīrkultūras izolēšanai, savairošanai un sekojošai identifikācijai. Izolētajām *E. coli* aizdomīgajām kolonijām veicām bioķīmisko testu pārbaudi, izmantojot oksidāzes (Oxidase Reagent Droppers, BD), ureāzes (Urea Agar (Christensen), Biolife), citrātu (Simmons Citrate agar, Oxoid) un indola (Tryptophan Peptone Water, Sifin; Kovacs` reagent, Biolife) testus. Ja identificējamā kultūra uzrādīja negatīvu oksidāzes, ureāzes, citrātu, bet pozitīvu indola testu – kultūra tika apstiprināta kā *E. coli*.

Sekojoši **apstiprinātajiem *E. coli* izolātiem** (n=615), kas iegūti pirmajā pētījuma aktivitātē, kā arī 80 *E. coli* izolātiem, kas iegūti no Otrās pētījuma aktivitātes rektālajiem paraugiem (n=46) **veicām baktēriju jutības noteikšanu pret 12 antibiotiku līdzekļiem. Aizdomīgajām ESBL producējošajām *E. coli* kolonijām** (n=144) **veicām fenotipisko apstiprināšanas** testu (ESBL producēšanas apstiprināšanai). No apstiprinātajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=144) atlasījām 50 *E. coli* izolātus (ar stratificētās nejaušības paraugu atlases metodi) un noteicām to jutību pret 18 antibiotiku līdzekļiem, kā arī veicām ESBL kodējošo gēnu klātbūtnes noteikšanu, izmantojot molekulāribioloģiskās metodes.

Fenotipiskais apstiprinošais tests ESBL producēšanai

Saskaņā ar EUCAST ieteikumiem (EUCAST, 2017b), izmantojām kombinēto disku testu (CDT) (2.4. attēls), lai apstiprinātu pirmajā aktivitātē izolēto aizdomīgo ESBL producējošo *E. coli* (n=144) spēju producēt ESBLs. CDT testu veicām saskaņā ar CLSI vadlīnijām (CLSI, 2018b).

Īsumā, sagatavojām standartizētu baktēriju saturošu suspensiju (0.5 McF) ar aizdomīgo ESBL producējošo *E. coli* kultūru un vienmērīgi inokulējām (izklaidējām) uz Millera-Hintona barotnes (Muller Hinton agar II, Biolife) virsmas, izmantojot sterilu vates kociņu. Sekojoši, izmantojot dispenseru, uznesām standartizētus antimikrobiālo vielu noteiktā koncentrācijā saturošus diskus – cefotaksīmu, 30 µg (CTX-30, BD BBL), ceftazidīmu, 30 µg (CAZ-30, BD BBL), cefotaksīmu ar klavulānskābi, 30 µg+10 µg (CTX CLA, BD BBL) un ceftazidīmu ar klavulānskābi, 30 µg+10 µg (CAZ CLA, BD BBL) un plates inkubējām 16-18 h, 36 ± 1 °C. Pēc inkubācijas izmērījām baktēriju audzes aiztures zonas diametrus ap katru no antimikrobiālajiem

diskiem ar un bez klavulānskābes. Ja baktēriju audzes aiztures zona bija lielāka vai vienāda ar 5 mm jebkuram antibakteriālajam līdzeklim, kas pārbaudīts kombinācijā ar klavulānskābi (CTX CLA un/vai CAZ CLA), salīdzinot attiecīgi ar tā zonu, bez klavulānskābes (CTX un/vai CAZ), tas tika interpretēts kā ESBL producējoša fenotipa pierādījums. Fenotipiskās apstiprināšanas testa laikā kvalitātes kontroles nolūkā izmantojām arī references celmu *E. coli* ATCC 25922 (Bioscience, Apvienotā Karaliste).



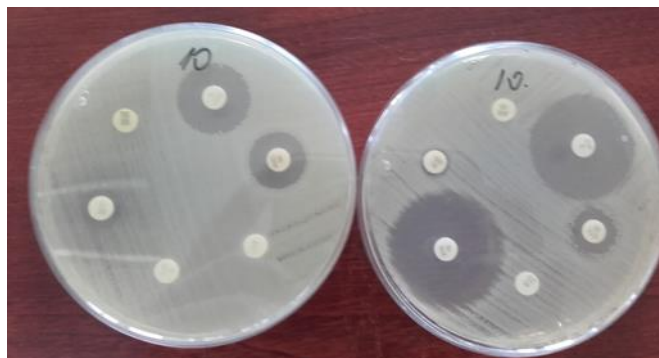
2.4. att. **Kombinētais disku tests fenotipiskai ESBL producējošu *E. coli* apstiprināšanai**
(foto: D. Gāliņa).

E. coli un ESBL *E. coli* jutības noteikšana pret antibiotikām

Pirmās pētījuma aktivitātes laikā (no katra fekāliju parauga izolētajam vienam *E. coli* izolātam (n=615) un atlasītajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (n=50)), kā arī Otrās pētījuma aktivitātes (no rektālajiem paraugiem, kas iegūti sivēnu ēdināšanas pētījuma) laikā izolētajiem *E. coli* noteicām jutību pret antibakteriāliem līdzekļiem saskaņā ar disku difūzijas metodes norādījumiem (EUCAST, 2017a). Izmantojām 12 antimikrobiālo vielu saturošus diskus (BD BBL Sensi-Disc, ASV) noteiktā koncentrācijā: ampicilīns (AM, 10 µg), amoksicilīns+klavulānskābe (AMC, 20 µg +10 µg), cefazolīns (CZ, 30 µg), cefotaksīms (CTX, 30 µg), imipenēms (IMP, 10 µg), sulfametoksazols+trimetoprimis (SXT, 23.75 µg+1.25 µg), trimetoprimis (TMP, 5 µg), gentamicīns (GM, 10 µg), hloramfenikols (C, 30 µg), tetraciklīns (TE, 30 µg), enrofloksacīns (ENO, 5 µg), ciprofloksacīns (CIP, 5 µg) (2.5. attēls).

Pēc inkubācijas, baktēriju audzes aiztures zonas diametru izvērtējam saskaņā ar EUCAST interpretācijas norādījumiem (EUCAST, 2019). Tā kā enrofloksacīns nav iekļauts EUCAST interpretācijas tabulās, to izvērtējam saskaņā ar ražotāja (BD BBL Sensi-Disc, ASV) ieteikumiem.

ESBL producējošajiem *E. coli* (n=50) izolātiem bez jau minētajām 12 antimikrobiālajām vielām, papildus noteicām jutību vēl pret 6 īpaši atlasītiem bēta-laktāma antibiotikām: mecilīnu (MEL, 10 µg), tikarcilīnu (TIC, 75 µg), cefaleksīnu (CL, 30 µg), cefoksitīnu (FOX, 30 µg), cefiksīmu (CFM, 5 µg) un cefepimu (FEP, 30 µg).



2.5. att. **Disku difūzijas metode *E. coli* jutības un rezistences noteikšanai pret 12 antibiotikām** (foto: D.Gāliņa)

Multirezistento *E. coli* noteikšana

Magiorakos ar līdzautoriem ir definējuši, ka baktērija ir multirezistenta, ja izolāts ir vienlaicīgi nejūtīgs pret vismaz vienu antibakteriālo līdzekli trīs un vairāk (≥ 3) pretmikrobu kategorijās (Magiorakos et al., 2012). Visiem *E. coli* izolātiem, kuriem veicām jutības noteikšanu pret antibiotikām, veicām arī izvērtēšanu attiecībā uz atbilstību multirezistentās baktērijas statusam. Turklāt, multirezistentos *E. coli* klasificējām atbilstoši multirezistences līmenim saskaņā ar Jahanbakhsha un tā līdzautoru ziņojumu (Jahanbakhsh et al., 2016), piemēram, MDR4 – izolāts nejūtīgs pret vismaz vienu pretmikrobo līdzekli četrās pretmikrobo līdzekļu kategorijās, MDR5 – izolāts nejūtīgs pret vismaz vienu pretmikrobo līdzekli piecās pretmikrobo līdzekļu kategorijās u.t.t.

Multirezistences izplatība starp ESBL producējošajiem *E. coli* tika raksturota dažādām sivēnu un cūku vecuma grupām: četru un sešu nedēļu veci sivēni saukti par “atšķirtajiem sivēniem”, astoņu, 12 un 20 nedēļu vecas cūkas sauktas par “nobarojamām cūkām” un “sivēnmātes”.

ESBL producējošo *E. coli* identificēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju

Pirmajā aktivitātē izolēto ESBL producējošo *E. coli* identifikāciju veicām Latvijas Lauksaimniecības universitātes Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās Bioloģijas un Mikrobioloģijas nodaļā. Fenotipiski apstiprinātos ESBL producējošos *E. coli* izolātus ($n=50$), kurus izmantojām paplašinātā spektra bēta-laktamāzes gēnu noteikšanai, tālāk identificējām/pārapstiprinājām arī, izmantojot VITEK MS (bioMérieux SA, Francija) identificēšanas sistēmu, kas balstās uz MALDI-TOF tehnoloģiju. Vispirms uznesām ar 1 μ L bakterioloģisko adatu 24 h vecu *E. coli* ATCC 8739 references celma kultūru uz FlexiMass-DS (Shimadzu Biotech) 48 iedobīšu polimēru MALDI MS plāksnītes centrālās (kontroles) iedobes un to vienmērīgi izlīdzinājām. Izmantojot automātisko pipeti, pievienojām 1 μ L VITEK MS CHCA (bioMérieux SA, Francija, 411071) reaģenta. Tad katru identificējamo kultūru ienesām divos atkārtojumos (divās secīgās) iedobēs un vienmērīgi izlīdzinājām, izmantojot 1 μ L bakterioloģisko adatu. Sekojoši pievienojām 1 μ L VITEK MS CHCA (bioMérieux SA, Francija, 411071) reaģentu. Pēc sagatavotās polimēru plāksnes nožūšanas, to reģistrējām VITEK MS sagatavošanas stacijas programmā (VITEK MS Prep Station, versija V2.3.3.) un ievadījām informāciju par identificējamajām kultūrām. Tad reģistrējām plāksnīti VITEK MS iegūšanas stacijā (VITEK MS Acquisition Station, versija V2.0.03), ievietojām nolasāmo plāksnīti adapterā un tad – VITEK MS (bioMérieux SA, Francija) iekārtā. Rezultātus nolasījām, atverot mērinstrumenta paneļa Windows interneta bioMérieux SA izstrādāto pārlūkprogrammu MYLA.

Izolēto *E. coli* un ESBL producējošo *E. coli* saglabāšana

Gan pirmajā ($n=615$), gan otrajā aktivitātē ($n=80$) izolētos un apstiprinātos *E. coli* un pirmajā aktivitātē izolētos ESBL producējošo *E. coli* izolātu ($n=144$) kultūras savairojām un pievienojām Triptozes sojas buljonam (Tryptic Soy Broth, Biolife) ar 20% v/v glicerīna piedevu. Katra 2 mL kriptomēģene saturēja 1 mL tīrkultūras suspensijas, tās uzglabājām temperatūrā, kas zemāka par -80°C .

Enterobacteriaceae dzimtas, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaita noteikšana

Lai analizētu barības komponentu ietekmi uz zarnu satura un fekāliju mikrobiotu, Otrās aktivitātes laikā iegūtajos sivēnu tievās un resnās zarnas satura paraugos ($n=28$) noteicām *Enterobacteriaceae* (Gram negatīvas, pret žults sāļiem rezistentās baktērijas), *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu, savukārt sivēnu fekāliju paraugos ($n=93$) noteicām *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaitu.

Sākotnējo suspensiju un sēriļveida decimālšķīdumus sagatavojām, izmantojot sāls peptona šķīdumu (Maximum Recovery Diluent, Biolife) saskaņā ar LVS EN ISO 6887-1:1999 standarta prasībām. Īsumā, 10.0 ± 0.01 g testa paraugu (fekālijas vai gremošanas saturu)

iesvērām homogenizatora maisīnā ar filtru un pievienojām 90.0 mL sāls peptona šķīdumu un homogenizējām 1 min, izmantojot BagMixer 400 iekārtu (Interscience, Francija). Tālāk 1 mL testa parauga ienesām ar seroloģisko pipeti 9 mL sāls peptona šķīdumā un sekojoši samaisījām 5-10 s, izmantojot vorteksa maisītāju V-1 plus (Biosan, Latvija). Fekāliju un gremošanas kanāla satura paraugiem sagatavojām sekojošus – 10^{-1} - 10^{-9} decimālšķīdumus.

Enterobacteriaceae dzimtas baktēriju izolēšanai un uzskaitēi izmantojām violeti sarkano žults glikozes agaru (Violet Red Bile Glucose agar (VRBG), Biolife) saskaņā ar LVS EN ISO 21528-2:2007 standarta prasībām. Ar automātisko pipeti sākotnējo suspensiju un tā sekojošos decimālšķīdumus viena mL apjomā pārnesām paralēlās (divās – katrai sākotnējai suspensijai un atšķaidījumam) sterilās Petri platēs. Tad uzlējām 10-15 mL 45-47 °C VRBG agara, samaisījām un ļāvām sacietēt. Pēc sacietēšanas vēl pārlejām ar 10-15 mL VRBG barotnes un atkal ļāvām sacietēt. Inokulētās plates inkubējām 36 ± 1 °C 24 ± 2 h. Pēc inkubēšanas atlasījām plates ar raksturīgo koloniju (0.5 mm un lielākas sarkanas līdz violetas ar vai bez precipitācijas zonas) skaitu (līdz 150) un veicām koloniju veidojošo vienību (kvv) uzskaiti. Tālāk brīvi izvēlētas piecas raksturīgas kolonijas pārsējām uz neselektīvās barotnes – Triptozes sojas agara (Tryptic soy agar (TSA), Biolife) subkultūras ieguvei. Inkubējām 36 ± 1 °C 24 ± 2 h. Negatīvs oksidāzes tests (BD Oxidase Reagent Droppers) un pozitīvs glikozes fermentācijas tests (Huhg Leifson Medium, Himedia) apstiprināja piederību *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju grupai.

E. coli izolēšanai un uzskaitīšanai izmantojām TBX agaru (Tryptone bile X-gluc (TBX) agar, Biolife) saskaņā ar LVS EN ISO 16649-2:2007 standarta prasībām. Vienu mL sākotnējās suspensijas un tā sekojošos decimālšķīdumus pārnesām paralēlās sterilās Petri platēs. Tad uzlējām 18 ± 2 mL, 46 ± 1 °C TBX barotnes, samaisījām un ļāvām sacietēt. Inokulētās plates apgriezām otrādi un inkubējām 44 ± 1 °C, 18-24 h. Pēc inkubācijas atlasījām plates ar raksturīgo koloniju (zilas) skaitu līdz 150 un veicām kvv uzskaiti. Papildus koloniju apstiprināšana saskaņā ar standartu nebija nepieciešama.

Lai izolētu un uzskaitītu ***Lactobacillus* spp.**, izmantojām MRS agaru ar polisorbāta 80 piedevu (MRS agar with Tween® 80, Biolife) saskaņā ar ražotāja ieteikumiem. Vienu mL sākotnējās suspensijas un tā decimālšķīdumus pārnesām paralēlās sterilās Petri platēs. Tad uzlējām 10 mL 45-47 °C MRS agaru un ļāvām sacietēt. Lai nodrošinātu mikroaerofilus apstākļus, plates pārlejām vēl ar 10-15 mL MRS agaru. Inkubējām 36 ± 1 °C, 72 ± 2 h. Pēc inkubācijas atlasījām plates ar raksturīgām (baltām) *Lactobacillus* spp. kolonijām ar skaitu līdz 300 un veicām kvv uzskaiti. Raksturīgās kolonijas apstiprinājām, izmantojot Grama krāsošanas metodi un katalāzes testu (ūdeņraža peroksīds RFF 3%, AS Rīgas farmaceitiskā fabrika). *Lactobacillus* spp. ir Gram pozitīvi koki vai nūjiņas ar negatīvu katalāzes testa reakciju.

Baktēriju skaita aprēķināšana 1 g testa parauga. Lai aprēķinātu *Enterobacteriaceae* dzimtas, *E. coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu vienā gramā parauga, izmantojām LVS EN ISO 8199:2019 standarta ieteikumus rezultāta aprēķināšanai. Rezultāti tika izteikti kā $\log_{10}$ kvv g^{-1} .

2.3.4. ESBL gēnu noteikšana, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes

Lai pierādītu ESBL gēna *bla* (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}) klātbūtni pirmās pētījuma aktivitātes laikā iegūtos ESBL producējošajos *E. coli* izolātos, izmantojām stratificētās nejaušības paraugu atlases metodi un atlasījām 50 izolātus no 144 fenotipiski pierādītajiem ESBL producējošajiem *E. coli* (atlasīto ESBL producējošo *E. coli* skaits proporcionāls konstatēto pozitīvo ESBL producējošo *E. coli* skaitam dažādās sivēnu un cūku vecuma grupās – četru, sešu, astoņu, 12 un 20 nedēļu vecas cūkas un sivēnmātes). Gēna *bla* klātbūtnes noteikšanai ESBL producējošajiem *E. coli* izmantojām polimerāzes ķēdes reakciju. Molekulārās bioloģijas izmeklējumus veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā.

DNS izdalīšanai izmantojām 18 ± 2 h vecu fenotipiski apstiprinātu ESBL producējošu *E. coli* tīrkultūru, kultivētu 36 ± 1 °C Luria-Bertani buljonā (Luria Bertani Broth, Sigma – Aldrich).

Baktēriju DNS izdalīšana. Baktēriju DNS izolēja, izmantojot E.Z.N.A. baktēriju DNS izolēšanas komplektu (Omega Bio-tek, ASV) un ņemot vērā ražotāja protokolu. Izdalītā DNS daudzumu kontrolēja, izmantojot ND-1000 spektrofotometru.

Polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) veica, izmantojot HotStarTaq®Plus Master Mix komplektu (QIAGEN, Vācija) saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Tika izmantoti sekojoši ESBL gēnu praimerī (J. Kim et al., 2009):

- 1) TEM – F: (5'-AGTGCTGCCATAACCATGAGTG-3') un TEM R: (5'-CTGACTCCCCGTCGTGTAGATA-3');
- 2) SHV – F: (5'-GATGAACGCTTTCCCATGATG-3') un SHV R: (5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3');
- 3) CTX M 1. grupa – F: (5'-TCCAGAATAAGGAATCCCATGG-3') un CTX M 1. grupa R: (5'-TGCTTTACCCAGCGTCAGAT-3').

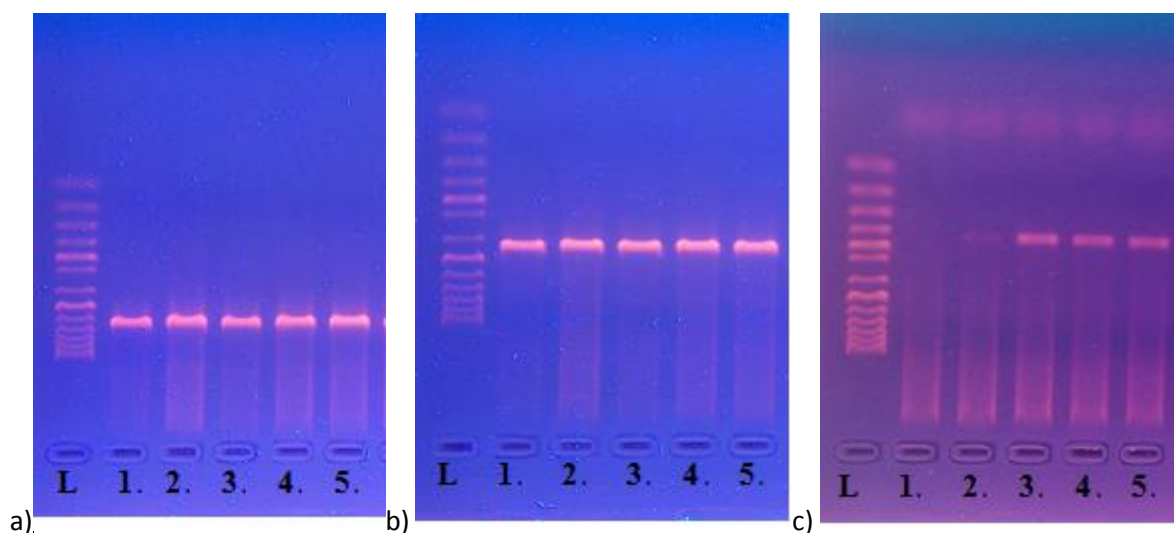
DNS amplificēšanas reakcija tika veikta, izmantojot termisko ciklistu ABI2770 (Applied Biosystems, ASV) ar sekojošiem parametriem: viens 5 minūšu solis 95 °C (sākotnējā denaturācija), tad sekojoši 35 vienas minūtes cikli 95 °C temperatūrā (denaturācija), praimerēšanas laikā reakcijas maisījumu atdzesēja līdz noteiktai temperatūrai atkarībā no praimera veida (viena minūte 55 °C (TEM), viena minūte 47 °C (SHV) un viena minūte 53 °C (CTX M)), tad viena minūte 72 °C (elongācija jeb ķēdes pagarināšanas solis), reakciju noslēdza ar beigu elongāciju 10 minūtes 72 °C temperatūrā.

DNS elektroforēze agarozes gēlā.

Pēc PCR reakcijas pabeigšanas, amplicēto DNS sadalīja, izmantojot elektroforēzi 2% agarozes gēlā. Paraugu DNS iekrāsoja ar etīdija bromīdu ($1 \mu\text{L mL}^{-1}$) un ievadīja agarozes gēla bedrītēs un sekojoši pakļāva elektriskajai strāvai (100V) vienu stundu.

Kā DNS izmēra marķieris tika izmantots 50 bp marķieris (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, SM0371). DNS fragmentu pozīcijas gēlā noteica, apskatot elektroforēzes gēlu transiluminatorā ultravioletajā starojumā un rezultāti tika dokumentēti fotografējot.

TEM pozitīvie izolāti bija 431 bp gari, SHV – 214 bp gari, bet CTX M – bija 621 bp gari (2.6. attēls).



2.6. att. ESBL producējošo *E. coli* DNS elektroforēze agarozes gēlā

L – DNS marķieris 50 bp (skatot no augšas: 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp), a) attēloti *bla*_{CTX-M} pozitīvie *E. coli* (1.-5.); b) attēloti *bla*_{TEM} pozitīvie *E. coli* (1.-5.); c) attēloti *bla*_{SHV} pozitīvie *E. coli* (3.-5.)

(foto: D. Gāliņa)

2.3.5. Sivēnu zarnu paraugu histoloģiskā izmeklēšana

Otrās pētījuma aktivitātes laikā iegūtos sivēnu tievās zarnas (*jejunum*) un resnās zarnas (*colon*) paraugus (n=28) fiksējām 10% buferētā neitrālā formalīna šķīdumā. Sekojoši paraugu sagatavošana histoloģiskajai izmeklēšanai notika LLU Veterinārmedicīnas fakultātes, Preklīniskā institūta Salīdzinošās Patoloģijas laboratorijā.

Paraugu sagatavošana histoloģiskajai izmeklēšanai. Fiksēto audu (*jejunum* un *colon* zarnas) paraugi tika piegriezti un ielikti audu kasetēs (Bio-Optica, Itālija). Tad paraugus apstrādāja audu procesorā LEICA ASP200S (Leica, Vācija). Audu procesors dehidratēja (atbrīvoja no ūdens un formalīna) paraugus, izmantojot pieaugošus alkohola koncentrācijas šķīdumus. Tad, izmantojot organisko šķīdinātāju ksilolu, attīrīja audus no spirta un sagatavoja parafīna uzņemšanai. Pēc audu apstrādes paraugi tika ieslēgti parafīna blokos, izmantojot ieguldīšanas iekārtu Tissue Embedding System TES 99 (MEDITE, Vācija). Kopā sagatavojām 28 parafīna blokus.

Ar mikrotomu preparātus sagrieza 4 µm biezus griezumus. No katra parafīna bloka sagatavoja sešus griezumus (n=168) un uznesa uz priekšmetstikliņiem (Deltalab, Spānija). Tad veica fiksāciju termostātā 37 °C, 16±4 h. Sekojoši attīrīja no parafīna, izmantojot ksilolu, un veica paraugu rehidratāciju ar spirtu koncentrācijas samazināšanas rindu. Sekojoši veica paraugu krāsošanu pēc Hematoksilīna – Eozīna metodes (H&E), Perjodskābes – Šiffa metodes (PAS) un Alciānzilā pH 2.5 metodes (AB).

Paraugu krāsošana pēc Hematoksilīna-Eozīna (H&E) metodes (Carson, 1997)

1. Hematoksilīns Mayer's (Bio-Optica, Itālija) – 2 min;
2. Skalošana tekošā ūdenī – 5 min;
3. Eozīns G vai Y alcoholic 0.5% (DiaPath, Itālija) – 3 min;
4. Skalošana tekošā ūdenī – 3 min.

Perjodskābes-Šiffa (PAS) reakcija (Kiernan J. A., 2008)

1. Periodskābe 1% (Bio-Optica, Itālija) – 5 min;
2. Skalošana destilētā ūdenī – 2 min;
3. Šifa reaģents (Sigma – Aldrich, ASV) – 15 min;
4. Skalošana tekošā ūdenī – 5 min;
5. Hematoksilīns Mayer's (Bio-Optica, Itālija) – 2 min;
6. Skalošana tekošā ūdenī – 5 min.

Alciānzilā (AB) pH 2.5 reakcija

Reakcijai izmantojām komerciāli pieejamo krāsošanas komplektu Alcian Blue pH 2.5-pH 1 (W01030799, Bio-Optica, Itālija) un reakcija veikta saskaņā ar ražotāja instrukciju.

1. Griezumus iegremdē destilētā ūdenī – 5 min;
2. Uznes uz griezuma 10 pilienus reaģentu A (Alciānzilā pH 2.5 šķīdums) un ļauj iedarboties 30 min;
3. Nosusina priekšmetstikliņu bez mazgāšanas un uz griezuma uznes 10 pilienus reaģentu B (Nātrija tetraborāta hidrospirta šķīdums) un ļauj iedarboties 10 minūtes;
4. Noskalo ar destilētu ūdeni.

Pēc paraugu krāsošanas ar histoloģiskajām reakcijām – paraugus dehidratēja ar pieaugošas koncentrācijas spirta rindu un dzidrināja jeb attīrīja ar ksilolu. Visbeidzot paraugus noslēdza ar ksilolā šķīstošu līmi (AppliChem, Vācija) un segstikliņu (DiaPath, Itālija).

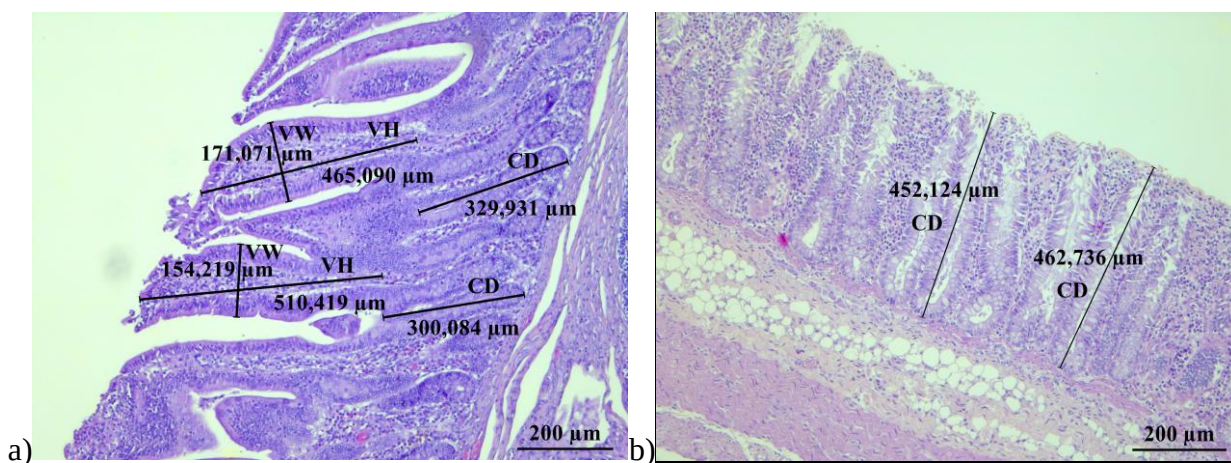
Histoloģisko griezumu mikroskopiskā izmeklēšana.

Gan tievās (*jejunum*), gan resnās (*colon*) zarnas histoloģisko griezumu (n=56) vispārīgais morfoloģiskais un **histopatoloģiskais stāvoklis** tika analizēts Pārtikas drošības, Dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR", Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā,

izmantojot gaismas mikroskopu (Zeiss, Vācija). Tika sagatavoti divi audu griezumumi katram paraugam un analizēti $100\text{-}1000\times$ palielinājumā. Tika noteikta iekaisuma smaguma pakāpe (ballēs no 0 līdz 4), iekaisuma izplatība (difūzs, lokāls, multifokāls), iekaisuma šūnu un eritrocītu daudzums (no 0 līdz 4) un raksturots iekaisuma veids, kā arī mikroorganismu klātbūtne.

Tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas **histomorfoloģiskie mērījumi** – zarnu bārkstiņu (*villi intestinales*) augstums (VH), platums (VW) un kriptu (*cryptae intestinales*) dziļums (CD), kausveida šūnu (*enterocyti calciformes*) skaits un blīvums tika analizēts H&E krāsotajos audu griezumos ($n=56$) LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā. **Neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošo kausveida šūnu diferencēšanu un skaitīšanu** veicām, analizējot pēc PAS un AB metodes krāsotus audu griezumus ($n=112$), izmantojot gaismas mikroskopu (Leica, DM3000LED, Vācija). Attēlus ieguvām, izmantojot kameru (Leica DFC450, Vācija). Iegūtos attēlus apstrādājām, izmantojot apstrādes un analizēšanas programmu (Leica Application Suite, versija 4.10.0). Griezumus mikroskopējām $100\text{-}400\times$ palielinājumā un ieguvām vairākus morfoloģiskos mērījumus – katrā paraugā trīs atkārtojumos atlasot un izmērot desmit labi orientētas zarnu bārkstiņu un kriptu struktūras. Zarnu bārkstiņas augstums tika mērīts no zarnu bārkstiņas virsotnes līdz bārkstiņas pamatnei. Bārkstiņas platumu mērījām zarnu bārkstiņas vidusdaļā, bet kriptas dziļumu – no kriptas ieliekuma (invaginācijas) zemākā punkta līdz bārkstiņas pamatnei (2.7. attēls (a un b)). Skaitījām kopējo kausveida šūnu skaitu tievās un resnās zarnas bārkstiņās un kriptās, un izteicām to kā $n/\text{kriptā}$, $n/\text{bārkstiņā}$ un blīvumu – kā kausveida šūnu skaitu attiecībā pret bārkstiņu augstumu vai kriptu dziļumu (μm) (2.8. attēls (a un b)).

Neitrālo un skābo mukopolisaharīdu šūnu skaitīšana. Izmantojot periodskābes-Šiffa un Alciān zilo (pH 2.5) reakcijas, diferencējām neitrālās un skābās mukopolisaharīdus saturošās šūnas. Neitrālo mukopolisaharīdu saturošās šūnas (PAS+) iekrāsojās purpura krāsā, bet skābo (AB+) mukopolisaharīdu šūnas – gaiši zilā krāsā (2.9. attēls (a un b)). Katrā paraugā trijos atkārtojumos atlasījām desmit labi orientētas zarnu bārkstiņas un kriptu struktūras. Noteicām neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošo šūnu skaitu bārkstiņās un kriptās, kā arī izteicām to blīvumu kā neitrālo un skābo mukopolisaharīdu saturošo šūnu skaitu attiecībā pret bārkstiņas augstumu un kriptu dziļumu (μm).

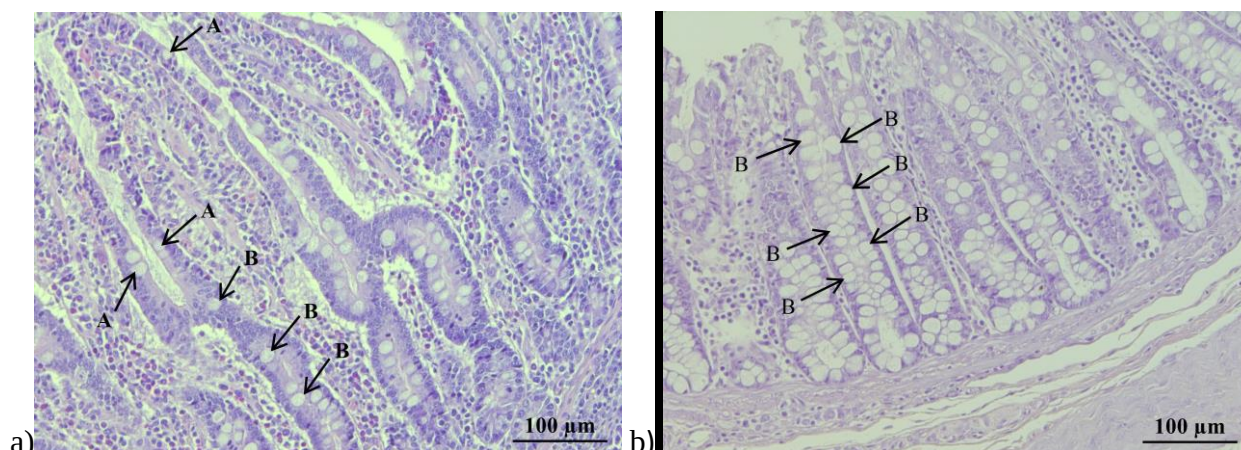


2.7. att. Tievās (*jejunum* (a)) un resnās (*colon* (b)) zarnas gļotādas apvidus morfometrisko mērījumu iegūšanas tehnika 56. dienu vecam sivēnam, H&E, $100\times$

a) tievās zarnas (*jejunum*) bārkstiņas garums (VH), bārkstiņas platums (VW) un kriptas dziļums (CD);

b) resnās zarnas (*colon*) kriptas dziļums (CD).

(foto: D. Gāliņa)

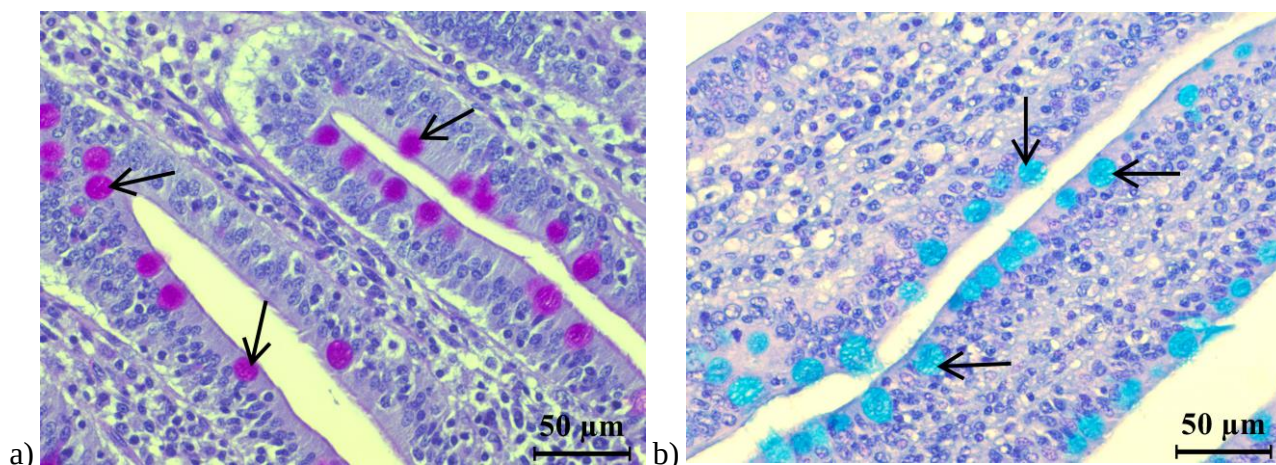


2.8. att. Kausveida šūnas tievās (*jejunum* (a)) un resnās (*colon* (b)) zarnas gļotādas apvidus griezumā 56. dienu vecam sivēnam, H&E, 200×

A – kausveida šūnas, kas lokalizētas zarnu bārkstiņās;

B – kausveida šūnas, kas lokalizētas zarnu kriptās.

(foto: D. Gāliņa)



2.9. att. Neitrālo (a) un skābo (b) mukopolisaharīdu producējošu kausveida šūnu diferencēšana tievās zarnas (*jejunum*) bārkstiņu apvidus griezumā 56. dienu vecam sivēnam a) PAS, b) AB (pH 2.5), 400×

a) neitrālo mukopolisaharīdu producējošās kausveida šūnas iekrāsotas purpura krāsā;

b) skābo mukopolisaharīdu producējošās kausveida šūnas iekrāsotas gaiši zilā krāsā.

(foto: D. Gāliņa)

2.3.6. Sivēnu zarnu paraugu imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Lai vizualizētu zarnu epitēlija šūnas to dzīvescikla aktīvajās fāzēs, noteicām kodola proteīnu Ki67, savukārt, lai identificētu T limfocītus sivēnu tievajā un resnajā zarnā, noteicām CD3 virsmas proteīnu, krāsojot sivēnu zarnu audu griezumus ar imūnhistoķīmijas metodēm, kas adoptētas un validētas Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centrā. Imūnreaktīvo (gan Ki67, gan CD3 pozitīvo) šūnu iezīmēšanai tika izmantots Dako EnVision®+System HPR reaģentu komplekts un reakcijas izpildītas saskaņā ar ražotāja protokolu. Imūnhistoķīmisko reakciju izpildes iekšējai kvalitātes kontrolei tika izmantoti pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi. Ņemot vērā nosakāmos rādītājus – Ki67 un CD3 pozitīvās šūnas, reakcijas izpildes laikā attiecīgi tika mainītas primārās antivielas – Ki67 kodola proteīna (Dako, clone MIB-1, IR621) un CD3 virsmas antivielas (Dako, A0452). Lai arī abas iepriekšminētās antivielas ir ražotas cilvēka šūnu proteīnu vizualizācijai, taču autoru ziņojumi

(Wiarda et al., 2020; Wiyaporn et al., 2013) pierāda šo antivielu spēju iezīmēt arī attiecīgos šūnu proteīnus cūkām.

No parafīna blokos ieslēgtajiem paraugiem tika sagatavoti griezumi (n=112) un tie uznesti uz imūnhistoķīmijas mikroskopijas stikliņiem (Aptaca, Itālija) un fiksēti 60 °C 1 h. Deparafinizācijai izmantoja ksilolu 20 min un rehidratācijai absolūto (100%) etanolu – 2 min, etanolu 96% – 2 min un etanolu 70% – 20 min. Tad skaloja ar destilētu ūdeni. Epitopus atbrīvoja ar HIER pH 9 buferi (Target Retrieval Solution (10x), pH 9, Dako, S2367), sekojoši karsējot mikroviļņu krāsnī 350W – 15 min un 750W – 7 min. un atdzesēja līdz 70 °C, atkārtotot procesu 3 reizes. Tad sekoja 20 min dzesēšana istabas temperatūrā HIER buferī. Endogēno peroksidāzi bloķēja, apstrādājot 10 min ar endogēnās peroksidāzes bloķētāju (Endogenous enzyme block, Dako, SM801) un sekojoši noskaloja ar TSB buferi (pH 7.4) (Wash Buffer 10x, Dako) divas reizes pa 5 min.

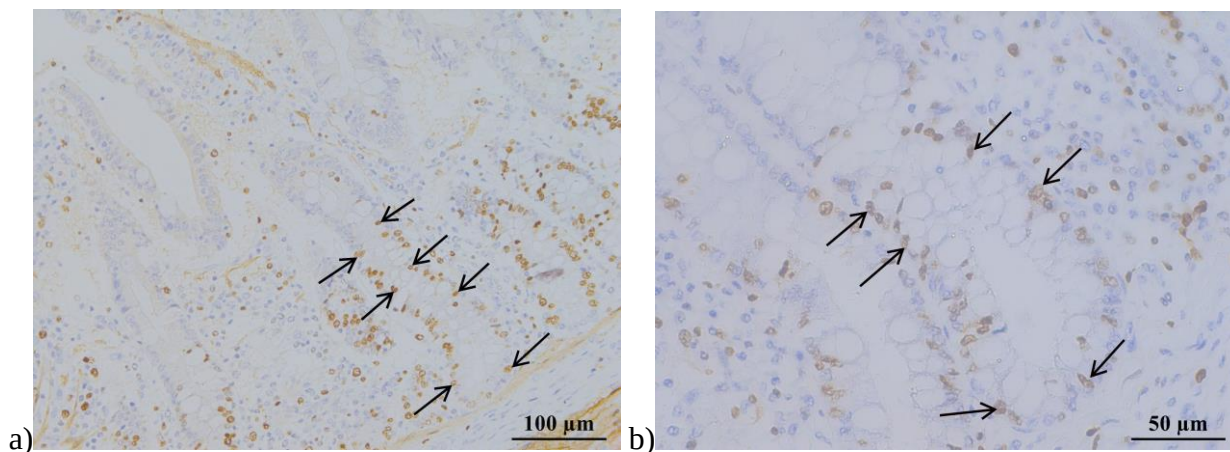
Lai identificētu CD3 un Ki67, uz attiecīgajiem audu griezumiem tika uznestas primārās antivielas un inkubētas 60 min. Antivielas CD3 izmantoja atšķaidījumā 1:200 (šķīdinātājs – Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako, S3022), bet Ki67 atšķaidījums bija gatavs lietošanai. Pēc inkubēšanas noskaloja ar TSB buferi (pH 7.4) (Wash Buffer 20x, Dako, K8000).

Tālāk audu antigēna un primārās antivielas kompleksa iezīmēšanai ar sekundāro antivielu izmantoja sekundārās antivielas reaģentu, atbilstoši primārās antivielas izcelsmei (EnVision+ Dual Link System-HRP, Dako, K5007) un inkubēja 45 min. Atkārtoti skaloja ar TSB buferi (pH=7.4) (Dako Wash Buffer 20x, K8000). Primārās un sekundārās antivielas kompleksa iekrāsošanai izmantoja DAB reaģentu 5 min (EnVision+Dual Link System-HRP (DAB+), Dako, K8010), lai varētu vizualizēt gaismas mikroskopā pozitīvās (brūnā krāsā) struktūras. Pēc tam griezumu iekrāsoja ar hematoksilīnu – 2 min, skaloja ar ūdeni 3-5 min un dehidrēja, izmantojot etanolu šķīdumus 70% – 1 min., 96% – 1 min, un 99.9% – 2 min., sekoja apstrāde ar ksilolu 2 min. Visbeidzot priekšmetstikliņi tika nosegti ar ksilolā šķīstošu līmi un segstikliņu.

Iekšējās kvalitātes kontroles nodrošināšanai, imūnhistoķīmiskās reakcijas izpildes laikā tika paralēli sagatavoti un krāsoti pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi, izmantojot cilvēka mandeles histoloģiskos griezumus no Rīgas Austrumu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Patoloģijas centra arhīva. CD3 un Ki67 pozitīvo šūnu identificēšanai tika nokrāsoti cilvēka mandeles histoloģiskie griezumi saskaņā ar ražotāja protokolu, kas aprakstīts iepriekš. Imūnreaktīvās CD3 šūnas galvenokārt lokalizējas mandeles ekstra-folikulārajā zonā; raksturīga CD3 pozitīvo šūnu membrānu iekrāsošanās brūnā krāsā, savukārt imūnreaktīvās Ki67 šūnas galvenokārt lokalizējas mandeles germinatīvajos centros, kur to īpatsvars sastādīja 80-90% no šūnu skaita; raksturīga Ki67 pozitīvo šūnu kodolu iekrāsošanās brūnā krāsā. Kā negatīvās kontroles tika lietoti paralēlie griezumi no iepriekšminētajiem audiem, bet primārās antivielas (CD3 un Ki67) tika aizvietotas ar antivielas šķīdinātāju (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako, S3022). Negatīvās kontroles paraugos netika konstatēta CD3 un Ki67 pozitīvo šūnu struktūru iekrāsošanās brūnā krāsā.

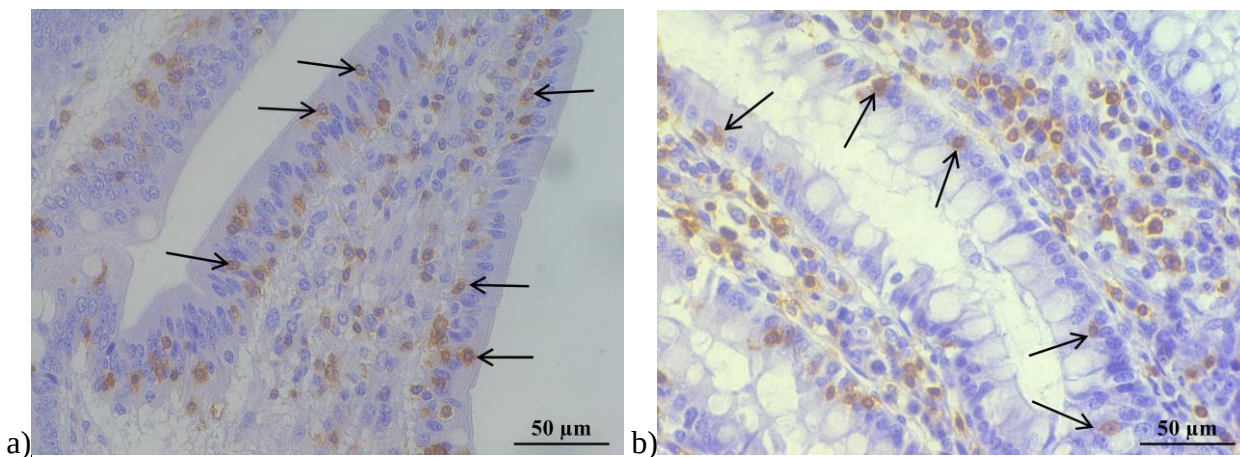
Imūnhistoķīmisko (IHC) griezumu mikroskopiskā analīze. Ar IHC metodi krāsotu sivēnu tievās un resnās zarnas griezumu analīzi veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskajā laboratorijā, Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā. Griezumu analīzei izmantojām 100-400× palielinājumu. Proliferējošo epitēlija šūnu (Ki67+) skaitu noteicām desmit labi orientētās tievās un resnās zarnas kriptu struktūrās (2.10. attēls) un izteicām kā pozitīvo šūnu skaitu 100 μm. Intraepiteliālo T limfocītu (IEL) (CD3+) skaitu noteicām desmit labi orientētās tievās un resnās zarnas bārkstiņu un kriptu struktūrās (2.11. attēls) un izteicām kā pozitīvo šūnu skaitu 100 μm. CD3 pozitīvo šūnu relatīvo biežumu analizējām *jejunum* un *colon lamina propria* (gan zarnu bārkstiņu, gan kriptu daļā), Peijera platēs (interfolikulu, kupola + folikulu zonā) un resnās zarnas submukozā (2.12. attēls). Katru paraugu analizējām desmit pēc nejaušības principa atlasītos redzes laukos katrai struktūrai. CD3 pozitīvās šūnas vizualizējām ar brūnu šūnas membrānu, bet Ki67 pozitīvām šūnām novērojām brūnā krāsā iekrāsotu kodolu.

Relatīvais CD3 pozitīvo šūnu biežums tika noteikts pēc puskvantitatīvās skaitīšanas metodes (Pilmane et al., 1998). Relatīvā biežuma apzīmēšanai lietojām sekojošus apzīmējumus: (0) – pozitīvās šūnas redzes laukā neatrod; (0/+) – dažas pozitīvas šūnas redzes laukā; (+) – neliels daudzums pozitīvo šūnu redzes laukā; (+/++) – maz līdz vidēji daudz pozitīvas šūnas redzes laukā; (++) – vidēji daudz pozitīvas šūnas redzes laukā; (++/+++) – vidēji daudz līdz daudz pozitīvas šūnas redzes laukā; (++++) – ļoti daudz pozitīvas šūnas redzes laukā. Datu statistiskai apstrādei, mikroskopa redzes laukā novērotais šūnu skaits 0, 0/+, +, +/++, ++, ++/+++, +++ tika kodēts attiecīgi kā 0, 1, 2, 3, 4, 5 un 6.



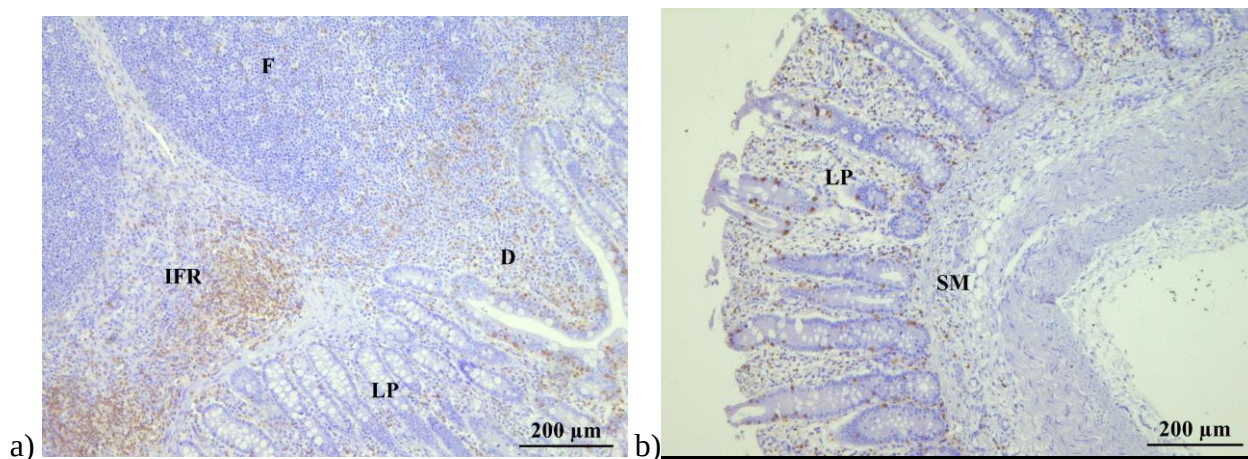
2.10. att. **Proliferējošo epitēlija (Ki67 pozitīvo) šūnu lokalizācija tievās (*jejunum* (a)) un resnās (*colon* (b)) zarnas gļotādas kriptās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, a) 200×, b) 400×**

Ar bultiņu norādītas Ki67 pozitīvās šūnas, kurām novēro brūnā krāsā iekrāsotu kodolu.
(foto: D. Gāliņa)



2.11. att. **Intraepitēliālo T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) lokalizācija tievās (*jejunum* (a)) zarnas gļotādas bārkstiņās un resnās (*colon* (b)) zarnas gļotādas kriptās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, 400×**

CD3 pozitīvajām šūnām novēro brūnā krāsā iekrāsotu šūnas membrānu.
(foto: D. Gāliņa)



2.12. att. T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) relatīvā biežuma noteikšana dažādās tievās (jejunum (a)) un resnās (colon (b)) zarnas struktūrās 56 dienu vecam sivēnam, DAB+hematoksilīns, 100×

CD3 pozitīvajām šūnām novēro brūnā krāsā iekrāsotu šūnas membrānu
LP – lamina propria, F – folikulu zona, D – kupola zona, IFR – interfolikulārā zona, SM – submukoza.
(foto: D. Gāliņa)

2.3.7. Asins hematoloģiskā un seruma bioķīmiskā analīze

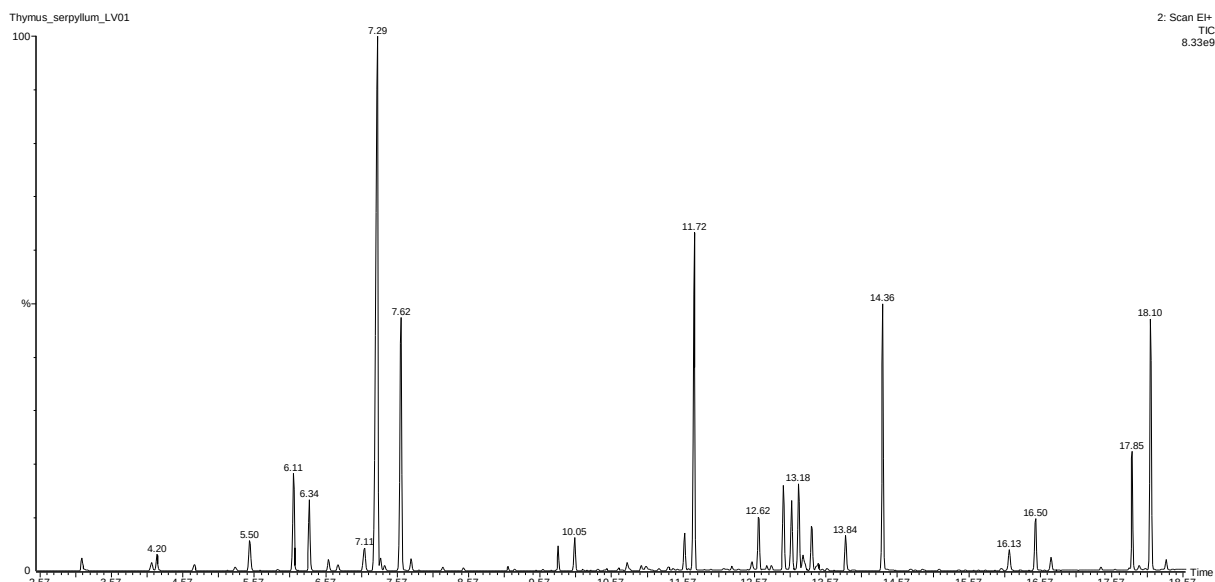
Sivēnu asins paraugu (n=50) hematoloģisko un seruma bioķīmisko analizēšanu veicām LLU Veterinārās klīnikas laboratorijā. Hematoloģijā tika noteikti sekojoši rādītāji: kopējais leikocītu (WBC), eritrocītu (RBC), granulocītu (GRAN), limfocītu (LYM) skaits, hematokrīts (HCT), hemoglobīns (HGB), vidējais eritrocītu tilpums (MCV), vidējais hemoglobīna saturs eritrocītā (MCH) un vidējā hemoglobīna koncentrācija eritrocītos (MCHC), izmantojot fotometrijas metodi ar veterināro hematoloģisko analizatoru (Exigo Eos, Boule Medical AB, Zviedrija). Serumā tika noteikti sekojošie rādītāji: glikoze (GLU), kalcijs (Ca), fosfors (P), gamma-glutamīltransferāze (GGT), sārmainā fosfatāze (ALP) un aspartātaminotransferāze (ASAT), izmantojot absorbcijas fotometrijas metodi ar klīnisko ķīmijas analizatoru (Mindray BS-200E, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Ķīna).

2.3.8. Taukskābju rādītāju noteikšana gaļas paraugos

Nepiesātināto un piesātināto taukskābju saturs gaļas paraugos (n=8) tika noteikts Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR”, Ķīmijas laboratorijā, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi saskaņā ar zinātniskā institūta “BIOR” izstrādāto darba instrukciju BIOR-T012-131-2011.

2.3.9. Augu ēterisko eļļu ķīmiskā satura noteikšana

Ķīmisko sastāvu gan mūsu pašu ekstrahētajām ēteriskajām eļļām (EO), gan komerciāli iegādātajām EO noteicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Agronomisko analīžu nodaļā, izmantojot gāzu hromatogrāfijas metodi (2.13. attēls).



2.13. att. *T. serpyllum* ēteriskās eļļas, kas ekstrahēta ar hidrodestilācijas metodi laboratorijas apstākļos, viegli gaistošo komponentu gāzu hromatogramma (foto: D. Gāliņa)

Ēterisko eļļu hromatogrāfiskās analīzes veiktas, lietojot „Perkin Elmer” firmas „Clarus 580” gāzu hromatogrāfu, kas aprīkots ar maselektīvo detektoru ar kvadrupolu tipa analizatoru „Clarus SQ 8 C”. Savienojumi izdalīti, izmantojot poli-etilēnglikola stacionārās fāzes Omegawax 250 kapilāro kolonnu (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm sorbenta slānīša biezums). Kolonnas termostata sākuma temperatūra 40 °C (iztur 1.5 min), tad paaugstina līdz 155 °C (11°C min⁻¹), tad līdz 185 °C (8 °C min⁻¹) un nobeidz pie 230 °C (15 °C min⁻¹) ar 1.3 min izturēšanas laiku (analīzes laiks 20 min). Nesējgāzes (hēlijs, tīrība 5.0) programmētais plūsmas ātrums 1.0 mL min⁻¹ ar plūsmas dalījumu 1:10 (22 mL min⁻¹). Paraugs šķaidīts cikloheksānā 1/100 v/v un ievadītais tilpums hromatogrāfijas sistēmā bija 1 μL. Detektora režīms: elektronu trieciena jonizācija (elektronu enerģija 70kV); jonu avota temperatūra: 230 °C; vadules temperatūra: 260 °C; kopējo jonu plūsmas režīms m/z intervālā: 28-300; jonu pavairotāja strāva: 1700V ar 0.2 s skenēšanas laiku (625 Daltoni sek⁻¹). Iekārtas vadību nodrošināja „TurboMass Ver6.0.0” programmatūra, bet datu apstrāde realizēta ar „NIST MS 2.2 Library (FairCom Corp., ASV)” datorprogrammu.

Viegli gaistošo ēterisko savienojumu koncentrācija aprēķināta ar ārējā standarta metodi, par standartvielu izmantojot kamparu, koncentrācijas diapazonā no 5.0-1000 μg mL⁻¹. Atsevišķi tika noteikta timola koncentrācija, konstruējot timola kalibrēšanas taisni. Iegūtās kampara un timola kalibrēšanas taisnes sekojoši vienādojumi: $y=2.54 \cdot 10^5 x - 6.35 \cdot 10^5$; $y=2.11 \cdot 10^5 x - 3.11 \cdot 10^6$ (y –signāla laukums, μV·s; x –koncentrācija, μg mL⁻¹), kur taišņu korelācijas koeficients nepārsniedza $R^2 > 0.9990$. Viegli gaistošo savienojumu aprēķini paraugos tika veikti ņemot vērā ēterisko eļļu īpatnējo blīvumu: *T. serpyllum* (LV – 0.882 g cm⁻³; C – 0.934 g cm⁻³), *T. vulgaris* (LV – 0.919 g cm⁻³; C – 0.914 g cm⁻³) un *S. montana* (LV – 0.925 g cm⁻³; C – 0.941 g cm⁻³). Atsevišķi ēterisko eļļu komponenti tika identificēti atbilstoši to izdalīšanās indeksiem (Iwanami et al., 1997; Keita et al., 2000; Njoroge et al., 1996; Tabanca et al., 2006), un tie tika salīdzināti ar atsauci spektru bibliotēkā (Wiley un NIST datu bāzes). Visiem ēteriskās eļļas komponentiem tika eksperimentāli noteikts izdalīšanās indekss, vadoties pēc n-alkānu izdalīšanās laiku programmētas temperatūras apstākļos, izmantojot divu funkciju aprēķinu vienādojumu (Mjøs, 2004).

2.3.10. Augu ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaude

Augu ēterisko eļļu un bagātināto (ar kaprīlskābi un NaCl) ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaudi veicām LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās Bioloģijas un Mikrobioloģijas nodaļā.

Lai noteiktu ēterisko eļļu antibakteriālo aktivitāti, pārbaudei izmantojām desmit *E. coli* izolātus. Seši no tiem bija ESBP producējošie *E. coli* izolāti, kas izolēti no cūku fekālijām un kuri saturēja visus trīs *bla* gēnus: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} un *bla*_{SHV}. Trīs bija *E. coli* izolāti, kas arī izolēti no cūku fekālijām, bet kuriem nenovēroja rezistenci ne pret vienu no 12 antibiotikām un viens – *E. coli* references celms ATCC 25922 (Bioscience, Apvienotā Karaliste).

Ēterisko eļļu antibakteriālo aktivitāti noteicām, izmantojot buljona mikroatšķaidījuma metodes minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC) noteikšanas testa principu (CLSI, 2018a), kā aprakstīts iepriekš (Mandriks et al., 2021), ar nelielām izmaiņām. Ar šī kvantitatīvā testa palīdzību noteicām ēterisko eļļu minimālo koncentrāciju (lielāko atšķaidījumu), kura redzami kavē baktēriju augšanu. Noteicām arī minimālo baktericīdo koncentrāciju (MBC), t.i., ēterisko eļļu minimālo koncentrāciju (lielāko atšķaidījumu), kura nepieciešama, lai panāktu baktēriju bojāeju, kas definēts kā sākotnējā inokulāta samazinājums par 99.5% (MBC 99.5%) un 95% (MBC 95%). Inhibēto baktēriju procentuālo daudzumu aprēķinājām saskaņā ar aprakstīto vienādojumu (Cheng et al., 2015).

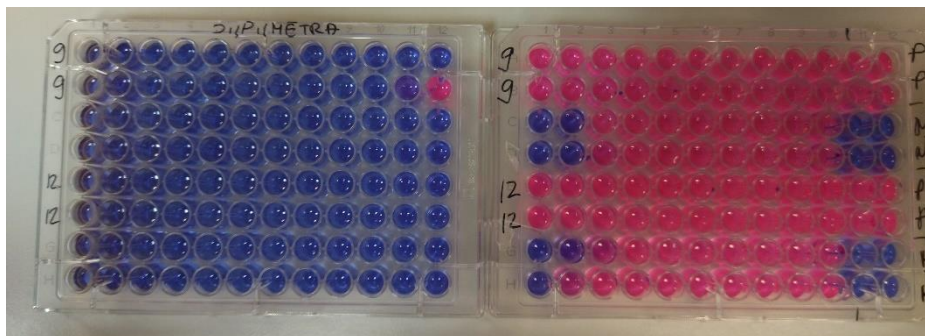
MIC un MBC noteikšana. Lai pagatavotu baktēriju saturošu inokulātu, izmantojām 20±2 h vecas *E. coli* tīrkuļtūras. Sākotnēji pagatavojām baktēriju saturošu suspensiju sāls peptona šķīdumā (Maximum Recovery Diluent, Biolife) ar blīvumu 0.5 McF un sekojoši veicām atšķaidījumus, lai sasniegtu $1.5 \cdot 10^6$ kvv mL⁻¹. Ēteriskās eļļas tika atšķaidītas ar DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, D2650) līdz koncentrācijai 500 µL mL⁻¹. Divās 96 iedobīšu platēs katrā iedobē ienesām 100 µL Millera-Hintona buljonu (Muller-Hinton Broth, Oxoid), tad pirmajā iedobītē ienesām testējamās 100 µL ēteriskās eļļas pagatavoto šķīdumu un veicām sērijveida atšķaidījumus. Paralēli veicām DMSO un gentamicīna 0.5 mg mL⁻¹ antibakteriālās efektivitātes kontroli – tiem veicot sērijveida atšķaidījumus tāpat kā ēteriskās eļļas šķīdumam. Visās testa iedobītēs pievienojām 50 µL baktēriju saturošu inokulātu un vēl 50 µL fizioloģisko šķīdumu (0.9% w/v) kā rezultātā katra iedobīte saturēja $5 \cdot 10^5$ kvv mL⁻¹. Ēteriskās eļļas koncentrācija iedobēs pēc sērijveida atšķaidīšanas bija no 125 µL līdz 0.000238 µL mL⁻¹. Vismaz divās iedobītēs ienesām tikai 200 µL Millera-Hintona buljona negatīvajai kontrolei un vismaz 2 iedobītēs ienesām 100 µL Millera-Hintona un 100 µL baktēriju saturošu suspensiju pozitīvajai kontrolei. No pozitīvās kontroles 1 µL inokulējām Millera-Hintona agarā (Muller Hinton agar II, Biolife), lai noteiktu kvv skaitu iedobītē un izmantotu MBC noteikšanai. Mikroplates inkubējām 36±1 °C, 20±2 h. Pēc inkubācijas nolasījām MIC, kas bija pēdējā dzidrā iedobe pirms iedobes, kurā nenovēro barotnes saduļķošanos vai gaišāku punktu iedobes apakšā. Lai noteiktu MBC, no katras dzidrās iedobes pārsējām 1 µL uz Millera-Hintona agara. Inkubējām 36±1 °C, 20±2 h un skaitījām kvv. Vismazākā ēterisko eļļu koncentrācija, kas nodrošināja 95% un 99.5% baktēriju nogalināšanu, tika apzīmēta kā MBC 95% un MBC 99.5%. Katras ēteriskās eļļas antibakteriālo efektivitātes pārbaudi atkārtojām divos atkārtojumos. MBC kontrolei un vizuālai dokumentēšanai, pievienojām katrā iedobītē 30 µL 0.01% w/v resazurīna nātrija sāls (Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich, 199303) ūdens šķīdumu un inkubējām 36±1 °C, 6 h. Ja iedobīte saturēja dzīvas baktēriju šūnas, tā iekrāsojās rozā, bet, ja nesaturēja, tad palika zilā krāsā (2.14. attēls). Neliela dzīvu baktēriju klātbūtne iekrāso bedrītes saturu violetā krāsā.

Bagātināto (ar kaprīlskābi un NaCl) ēterisko eļļu antibakteriālās efektivitātes pārbaude.

Ēteriskās eļļas un nātrija hlorīda aktivitātes noteikšanai izmantojām iepriekš aprakstīto MIC testa principu ar nelielām modifikācijām.

Sākotnēji tika sagatavots NaCl (Sodium chloride, Sigma-Aldrich, 31434-M) un dejonizēta ūdens šķīdums 12% w/v koncentrācijā. Šķīduma sterilitātes nodrošināšanai to

autoklavējām 121 °C 15 min autoklāvā. Testa izpildes laikā pirms baktēriju saturoša inokulāta ienešanas katrā no testa iedobēm pievienojām 50 µL 12% NaCl šķīdumu, kā rezultātā katra testa iedobīte saturēja 3% NaCl piedevas. Paralēli vismaz divās bedrītēs ienesām 100 µL Millera-Hintona buljona, 50 µL NaCl šķīdumu (12% w/v) un baktēriju saturošu inokulātu ar koncentrāciju $1.5 \cdot 10^6$ kvv mL⁻¹ ar mērķi noteikt 3% NaCl ietekmi uz baktēriju augšanas inhibēšanu vai baktericīdo efektu. Noteicām ēterisko eļļu un NaCl sinerģisma MBC 99.5% un MBC 95% kā aprakstīts iepriekš.



2.14. att. **Ēterisko eļļu minimālās baktericīdās koncentrācijas (MBC) kontrole un vizuāla dokumentēšana, pielietojot 0.01% w/v resazurīna nātrija sāls ūdens šķīdumu**

Iedobītes krāsa zila – nesatur dzīvas baktērijas, rozā – satur dzīvas baktērijas.

(foto: D. Gāliņa)

Ēteriskās eļļas un kaprilskābes aktivitātes noteikšanai izmantojām iepriekš aprakstīto MIC testa principu ar nelielām modifikācijām.

Saskaņā ar iepriekš ziņotiem datiem (S. A. Kim & Rhee, 2016), vidējo ķēžu taukskābes var izteikti pastiprināt baktericīdo efektu apvienojumā ar timolu vai karvakrolu, kas ir sastopams lūpziežu dzimtas augu ēterisko eļļu sastāvā (Boskovic et al., 2015). Mēs noteicām 1.0 mM kaprilskābes piedevas ietekmi, lai samazinātu nepieciešamās ēteriskās eļļas daudzumu un panāktu baktēriju augšanas kavēšanu un to nonāvēšanu.

Testa izpildes vajadzībām sākotnēji tika pagatavots 4.0 mM kaprilskābes šķīdums. Tā kā kaprilskābe slikti šķīst ūdenī, tad nepieciešamais vielas daudzums sākotnēji tika izšķīdināts 20% spirta-destilēta ūdens šķīdumā.

MIC testa izpilde tika veikta līdzīgi kā ēteriskās eļļas un nātrija hlorīda sinerģisma noteikšanā, tikai testa izpildes laikā pirms baktēriju saturoša inokulāta ienešanas katrā no testa iedobēm, pievienojām 50 µL 4 mM kaprilskābes spirta-ūdens šķīdumu, kā rezultātā katra testa iedobe saturēja 1.0 mM kaprilskābes piedevas. Paralēli vismaz divās bedrītēs ienesām 100 µL Millera-Hintona buljona, 50 µL kaprilskābes (4.0 mM)-spirta-ūdens šķīdumu un baktēriju saturošu inokulātu ar koncentrāciju $1.5 \cdot 10^6$ kvv mL⁻¹ ar mērķi noteikt 1.0 mM kaprilskābes spirta-ūdens šķīduma ietekmi uz baktēriju augšanas inhibēšanu vai baktericīdo efektu. Sekojoši noteicām ēterisko eļļu un kaprilskābes MBC 99.5% un MBC 95% kā aprakstīts iepriekš.

2.3.11. Datu statistiskā analīze

Visiem kvantitatīvajiem mērījumiem tika aprēķināts izlases vidējais lielums – vidējais aritmētiskais ($\bar{x}$) un izkliedes rādītājs – standartnovirze (SD). Lai raksturotu kļūdas lielumu, kas veidojas, aizstājot ģenerālkopu ar izlasi, aprēķinājām izlases vidējo standartkļūdu (SE).

Lai raksturotu pret dažādām antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību un ESBL producējošā *E. coli* sastopamības atšķirības starp lielajām un mazajām saimniecībām, kā arī starp dažāda vecuma cūku grupām, izmantojām χ^2 testu (*Chi-Square test*). Ja atradām būtiskas izplatības atšķirības, tad veicām pāru salīdzināšanas *post-hoc* testu, kurā noteicām atšķirības starp grupām. Izmantojot Fišera testu, salīdzinājām rezistences izplatību pret dažādām

antibiotikām un bēta-laktamāzes gēnu sadalījuma būtiskuma atšķirību ESBL-producējošiem *E. coli* izolātiem lielajās un mazajās saimniecībās. Noteicām ESBL gēnu ietekmi uz antimikrobiālās rezistences fenotipisko izpausmi, izmantojot izredzes attiecību (*odds ratio*) un 95% ticamības intervālu.

Vienfaktoru dispersijas analīzi izmantojām, lai noteiktu faktora (barības komponenta veids) ietekmi uz pētāmajām pazīmēm – asins bioķīmijas un hematoloģijas rādītājiem, baktēriju populācijas izmaiņām, tievās un resnās zarnas histomorfoloģiskajām izmaiņām un taukskābju sastāva izmaiņām *m. Longissimus thoracis et lumborum*. Ja konstatējām būtisku faktora iedarbību, tad veicām Dankana daudzpakāpju testu kā *post-hoc* testu, kurā noteicām, starp kurām pētnieciskajām grupām jeb faktora gradācijas klasēm pastāv būtiskas atšķirības.

Lai pētniecisko grupu dzīvniekiem izvērtētu CD3 pozitīvo šūnu relatīvā biežuma (semikvantitatīvo datu) izplatības būtiskumu, izmantojām neparametrisko Kruskala-Vallisa (*Kruskal-Wallis*) testu, kas paredzēts vairāku neatkarīgu grupu salīdzināšanai pēc vienas pazīmes. Noraidot nulles hipotēzi, kā *post-hoc* testu izmantojām Konovera-Imana (Conover-Iman) vairāku pāru salīdzināšanas testu, kurā noteicām būtiskuma atšķirības starp grupām.

Divu faktoru dispersijas analīzi izmantojām, lai noteiktu faktoru ēterisko eļļu izcelsme (komerciālā un Latvijas) un ēterisko eļļu veids (*T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana*) ietekmi uz pētāmo pazīmi – antibakteriālo darbību (MIC vai MBC). Tāpat divu faktoru dispersijas analīze tika izmantota, lai noteiktu faktoru (komerciālās ēteriskās eļļas veids) un bagātinošās piedevas (kapriļskābes, NaCl) ietekmi uz pētāmo pazīmi – antibakteriālo darbību (MIC vai MBC). Noraidot nulles hipotēzi, kā *post-hoc* testu izmantojām Bonferroni testu, lai noteiktu būtiskuma līmeni starp grupām. T-testu saistītām paraugkopām izmantojām, lai salīdzinātu iegūto pazīmju (MIC un MBC) vidējās vērtības katram ēteriskās eļļas veidam, savukārt t-testu nesaistītām paraugkopām izmantojām, lai salīdzinātu katras komerciālās ēteriskās eļļas (ar/bez piedevas) MIC vidējās vērtības pret ESBL producējošiem un ESBL ne-producējošiem, kā arī MDR un ne-MDR *E. coli*.

Rezultātus uzskatījām par statistiski nozīmīgiem, ja p-vērtība bija mazāka par 0.05. Atsevišķos gadījumos rezultātiem tika noteikta tendence uz nozīmīgumu, ja p-vērtība bija intervālā no 0.05-0.10. Pētījuma rezultātu datu ievadei un datu vizuālajai atainošanai izmantojām datorprogrammu Microsoft Excel 2016 (16.0.4266.1001). Datu statistisko apstrādi veicām ar R Studio programmu (versija 1.1.463).

3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI

3.1. Pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatība cūkkopības saimniecībās

3.1.1. Biežāk lietotās antibiotikas cūku ārstēšanā un sivēnu diarejas profilaksē pētījumā iekļautajās saimniecībās

Saskaņā ar pētījumā iekļauto cūkkopības saimniecību īpašnieku un veterinārārstu sniegto informāciju, divās lielajās saimniecībās sivēnu diarejas sastopamība tika raksturota kā bieža un aktuāla problēma (L1 un L2), bet pārējās divās – ka diareja ir gadījuma raksturs jeb to novēro sporādiski (L3 un L4). Mazajās saimniecībās tikai viena (S1) no trim saimniecībām norādīja, ka diareja sivēniem ir aktuāla problēma un ir bieži novērojama.

Vairums saimniecības cūku ārstēšanā plaši lietoja penicilīnus un plašas darbības penicilīnus, bet cefalosporīnu lietošanu cūku ārstēšanā norādīja divas saimniecības (L1 un L3).

No ne-bēta laktāmu grupas antibiotikām visbiežāk cūku ārstēšanā izmantoja oksitetraciklīnu, trimetoprima/sulfadiazīnu un fluorohinolonu grupas antibiotikas.

Profilaktiski lielajās saimniecībās sivēnu atšķiršanas un pēcatšķiršanas periodā lietoja cinka oksīdu 150 mg kg⁻¹ barības, taču vienā (L3) no lielajām saimniecībām pēcatšķiršanas periodā izēdinātais cinka oksīda daudzums barības maisījumā sasniedza 2500 mg kg⁻¹.

Cūkkopības saimniecībās, kurās novēroja lielāku sivēnu diarejas aktualitāti, tika veikta sivēnmāšu un jauncūku aktīvā imunizācija ar Porcilis ColiClos vakcīnu, kas satur *E. coli* vairāku fimbriju (skropstiņu) adhezīnus un *Clostridium perfringens* C tipa bēta toksīnu (3.1. tabula).

Cūkkopības saimniecību raksturojums, profilaktiskie pasākumi un visbiežāk lietotās antibiotikas cūku ārstēšanai

Saimniecība	Sivēnmāšu skaits	Sivēnu atšķiršanas vecums (dienās)	Diarejas sastopamība /kritiskie periodi sivēnu dzīvē	Izbarotās barības piedevas cūkām	Lietotās antibiotikas cūku ārstēšanai			Imunizācija pret <i>Escherichia coli</i> ^b
					penicilīni/plaša spektra penicilīni	cefalosporīni	Citas lietotās antibiotikas	
L1	2100	28	bieži/ 1. – 3. diena; 4. – 6. nedēļa; 7. – 8. nedēļa	ZnO – 150mg kg ⁻¹	jā (AMX)	jā CFT	CS, ENO, MAR, OT, SXT ^a	jā
L2	700	33	bieži/ 2. – 3. nedēļa; 5. – 6. nedēļa	ZnO – 150mg kg ⁻¹ ; atšķiršanas periodā – cinka un elektrolītu saturošs preparāts ^c	jā (P, AMX)	nē	GM,OT, TMP+S,	jā
L3	1700	28	sporādiski	ZnO – 150mg kg ⁻¹ ; ZnO 2500mg kg ⁻¹ – 2–3 nedēļas pēc atšķiršanas); ūdens paskābināšana ^d	nē	jā (CFT, CFQ)	CS, ENO, GM, OT, TMP+S,	jā
L4	1000	28	sporādiski	ZnO – 150mg kg ⁻¹ ;	jā (P, AMC)	nē	OT TMP+S,	nē
S1	15	28	bieži/ 5. – 6. nedēļa	-	jā (P, AMX)	nē	ENO, OT, TMP+S	jā
S2	40	28-42	reti	-	nē	nē	TY	nē
S3	20	40	reti	-	nē	nē	TM	nē

AMX – amoksicilīns, AMC – amoksicilīns+klavulānskābe, CFT – ceftiofur, CFQ – cefkvīnoms, CS – kolistīns, ENO – enrofloksacīns, GM – gentamicīns, OT – oksitetraciklīns, P – penicilīns, MAR – marbofloksacīns, TM+S – trimetoprimis+sulfadiazīns, ZnO – cinka oksīds.

^a – saskaņā ar saimniecības menedžmentu, antibiotikas cūku ārstēšanai maina ik pēc trim mēnešiem, lai nodrošinātu pretmikrobu līdzekļu efektivitāti; ^b – sivēnu pasīvai imunizācijai pret dažādu celmu *E. coli* infekcijām, aktīvi imunizējot sivēnmātes, jauncūkas, “Porcilis ColiClos” (AN Boxmeer, Nīderlande), ^c – “Revitfit (veromin)” (Agro-strefa, Polija), ^d – “Baracid”, (Fermo, Polija).

3.1.2. *E. coli* rezistence pret antibiotikām cūku populācijā

Cūku populācijā, pamatojoties uz antimikrobiālās rezistences rezultātiem, kas iegūti, analizējot cūku fekālijās esošo komensiālo *E. coli*, novēro ļoti augstu rezistences līmeni pret tetraciklīnu 54.63% (n=336) un augstu rezistences līmeni pret tādām antibiotikām kā ampicilīnu 32.03% (n=197), trimetoprimu 24.07% (n=148), sulfametoksazolu-trimetoprimu 22.44% (n=138) un amoksicilīnu-klavulānskābi 22.28% (n=137).

Zems rezistences līmenis tiek vērtēts pret tādām antibiotikām kā fluorokvinaloniem (enrofloksacīns – 8.78%, ciprofloksacīns – 3.58%), gentamicīnu (5.69%), cefazolīnu (4.55%) un trešās paaudzes cefalosporīniem (cefotaksīmu) – 1.46%. Nevienam no izolētajiem *E. coli* nenovēroja rezistenci pret karbapenēmu grupas antibiobiotiku – imipenēmu (3.2. tabula).

3.2. tabula

Pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatība (%) cūku populācijā

Antimikrobiālo līdzekļu kategorijas pēc (Magiorakos et al., 2012)	Antimikrobiālais līdzeklis	Rezistentu <i>E. coli</i> izplatība %, (n)
Penicilīni	Ampicilīns	32.03 (197)
Penicilīni + bēta-laktamāzes inhibitori	Amoksicilīns-klavulānskābe	22.28 (137)
Šaura spektra cefalosporīni	Cefazolīns	4.55 (28)
Paplašināta spektra cefalosporīni	Cefotaksīms	1.46 (9)
Karbapenēmi	Imipenēms	0 (0)
Tetraciklīni	Tetraciklīns	54.63 (336)
Aminoglikozīdi	Gentamicīns	5.69 (35)
Folātu ceļa inhibitori	Sulfametoksazols-trimetoprimis	22.44 (138)
	Trimetoprimis	24.07 (148)
Fenikoli	Hloramfenikols	12.68 (78)
Fluorohinoloni	Enrofloksacīns	8.78 (54)
	Ciprofloksacīns	3.58 (22)

Analizējot *E. coli* rezistences fenotipus, konstatējām, ka vismaz pret vienu antibiotiku bija rezistenti 64.9% (n=399) no izolētajiem *E. coli*, turklāt atklājām kopumā 89 dažādus *E. coli* rezistences fenotipus.

Visbiežāk novērotie rezistences fenotipi bija: TE (19.0%, n=117), AM-AMC-TE (6.5%, n=40), AM-SXT-TMP-TE (4.9%, n=30), SXT-TMP-C-TE (2.3%, n=14). 48% no izolētajiem rezistentajiem *E. coli* fenotipiem bija pārstāvēti tikai pa vienam, taču, neskatoties uz fenotipu lielo dažādību, nereti tiem novēroja kombinēto rezistenci pret ampicilīnu, amoksicilīnu-klavulānskābi, trimetoprimu, sulfametoksazolu-trimetoprimu, hloramfenikolu, tetraciklīnu un enrofloksacīnu (3.3. tabula).

Izolēto komensiālo *E. coli* rezistences fenotipu dažādība, n=615

Rezistences fenotips	n	Rezistences fenotips	n	Rezistences fenotips	n
TE	117	C	3	AM CIP SXT TMP TE ENO	1
AM AMC TE	40	AM AMC C TE	2	AM CTX AMC TE	1
AM SXT TMP TE	30	AM AMC GM SXT TMP C TE	2	AM CTX CZ	1
SXT TMP C TE	14	AM AMC GM SXT TMP TE	2	AM CTX CZ AMC SXT TMP TE	1
AM TE	10	AM CIP AMC TE ENO	2	AM CTX CZ SXT TMP C TE ENO	1
TMP TE	10	AM CIP SXT TMP C TE ENO	2	AM CTX CZ SXT TMP TE	1
AMC	8	AM GM AMC SXT TMP C TE ENO	2	AM CTX CZ TE ENO	1
AM AMC SXT TMP TE	7	AM GM SXT TMP TE	2	AM CZ AMC	1
AM AMC SXT TMP C TE	6	AM SXT TE	2	AM CZ AMC SXT TMP C TE	1
AM CZ AMC TE	6	AMC TE	2	AM CZ GM AMC SXT TMP C TE ENO	1
AM AMC SXT TMP	5	CIP	2	AM CZ GM SXT TMP ENO	1
AM AMC TE ENO	5	ENO	2	AM GM AMC C TE	1
AM CZ AMC C TE	5	SXT	2	AM GM C TE	1
SXT TMP	5	SXT TMP C	2	AM GM SXT TMP TE	1
SXT TMP TE	5	SXT TMP C TE ENO	2	AM GM TMP C TE ENO	1
TE ENO	5	TMP C	2	C TE	1
AM	4	AM AMC TE	1	CIP SXT TMP ENO	1
AM AMC SXT TMP ENO	4	AM AMC CIP SXT TMP C TE ENO	1	CTX TE	1
AM GM AMC SXT TMP C TE	4	AM AMC CIP TE ENO	1	CZ	1
AM GM SXT TMP C TE	4	AM AMC CZ SXT TMP ENO	1	CZ GM AMC SXT TMP ENO	1
GM TE	4	AM AMC GM C TE	1	GM SXT TMP ENO	1
AM AMC	3	AM AMC GM SXT TMP	1	GM SXT TMP TE	1
AM AMC SXT TMP C	3	AM AMC GM SXT TMP C TE ENO	1	GM SXT TMP TE ENO	1
AM C TE	3	AM AMC TMP TE	1	GM TE ENO	1
AM CIP AMC SXT TMP C TE ENO	3	AM C	1	SXT TE	1
AM CIP AMC SXT TMP TE ENO	3	AM C ENO	1	SXT TMP C ENO	1
AM CTX CZ AMC	3	AM CIP	1	SXT TMP ENO	1
AM SXT TMP	3	AM CIP AMC C TE	1	TMP	1
AMC SXT TMP TE	3	AM CIP CZ AMC C TE	1	TMP C TE	1
AM CIP CZ AMC TE ENO	1	AM CIP SXT C TE ENO	1	pret antibiotikām jutīgie <i>E. coli</i>	216

AM – ampicilīns, CIP – ciprofloksacīns, CTX – cefotaksīms, CZ – cefazolīns, IPM – imipenēms, GM – gentamicīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, C – hloramfenikols, TE – tetraciklīns, ENO – enrofloksacīns.

Salīdzinot pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību lielajās un mazajās saimniecībās, rezultāti atklāj, ka būtiski ($p<0.01$) augstāka rezistentā *E. coli* izplatība novērojama lielajās saimniecībās pret astoņām no 12 antibiotiku saturošajām vielām: ampicilīnu, amoksicilīnu-klavulānskābi, sulfametoksazolu-trimetoprimu, trimetoprimu, gentamicīnu, tetraciklīnu, hloramfenikolu un enrofloksacīnu. Savukārt, ne pret vienu no antibiotikām nenovēroja būtiski augstāku rezistenci mazajās saimniecībās, salīdzinot ar lielajām. Rezistences līmenis pret tādām antibiotikām kā ciprofloksacīns, cefotaksīms un cefazolīns būtiski neatšķīrās starp lielajām un mazajām saimniecībām un tika vērtēts kā zems līdz ļoti zems (3.4. tabula).

Pret desmit no 12 antibiotikām novēroja būtiskas rezistentā *E. coli* izplatības atšķirības lielajās saimniecībās. Pret ciprofloksacīnu un imipenēmu visās fermās izplatības būtiskums nemainījās, saglabājot visās fermās zemu līdz ļoti zemu antimikrobiālās rezistences līmeni. Savukārt mazajās saimniecībās pret deviņām no 12 antibiotikām novēroja nebūtiskas atšķirības saimniecību vidū, turklāt saglabājot visās zemu līdz ļoti zemu antimikrobiālās rezistences līmeni.

No lielajām saimniecībām, ārkārtīgi augsts rezistences līmenis tika novērots pret ampicilīnu (L4 saimniecībā, 72.55%), pret amoksicilīnu-klavulānskābi (L4 saimniecībā, 71.57%), pret tetraciklīnu (L1 un L4 saimniecībās, attiecīgi 70.87% un 82.35%). Ļoti augsts rezistences līmenis tika novērots pret sulfametoksazolu-trimetoprimu (L1 saimniecībā 50.43%) un trimetoprimu (L1 saimniecībā, 50.17%), tetraciklīnu (saimniecībās L1 un L3, attiecīgi 66.09% un 51.24%). Pret tādām kritiski svarīgām antibiotikām kā fluorohinaloni (enrofloksacīns) augstu rezistences līmeni novēroja saimniecībā L1 (28.70%), savukārt pret trešās paaudzes cefalosporīniem augstākais izplatības līmenis bija saimniecībā L2, taču kopumā tas tika vērtēts kā zems rezistences līmenis (5.51%) (3.4. tabula).

3.4. tabula

Pret antibiotikām (AB) rezistentā *E. coli* izplatība (%) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās

AB	Rezistento <i>E. coli</i> izplatība, %									P vērtība
	Lielās saimniecības, (n=465)					Mazās saimniecības, (n=150)				
	L1 (n=115)	L2 (n=127)	L3 (n=121)	L4 (n=102)	$\bar{x}$	S1 (n=40)	S2 (n=69)	S3 (n=41)	$\bar{x}$	
AM	35.65	29.92	26.45	72.55	39.78	7.50	13.04	0.00	8.00	<0.001
CIP	5.22	0.79	7.44	3.92	4.30	2.50	1.45	0.00	1.33	0.213
CTX	0.87	5.51	0.83	0.00	1.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.488
CZ	5.22	4.72	1.65	11.76	5.59	0.00	2.90	0.00	1.33	0.114
IMP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.000
GM	22.61	3.94	0.00	3.92	7.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.006
AMC	24.35	7.87	14.05	71.57	27.53	7.50	8.70	0.00	6.00	<0.001
SXT	50.43	22.83	25.62	17.65	29.25	2.50	1.45	0.00	1.33	<0.001
TMP	50.17	24.41	32.23	15.67	31.40	2.50	1.45	0.00	1.33	<0.001
C	31.30	4.72	9.09	20.59	15.91	0.00	4.35	2.44	2.67	<0.001
TE	66.09	70.87	51.24	82.35	67.10	15.00	8.70	29.27	16.00	0.003
ENO	28.70	1.57	9.92	5.88	11.40	2.50	0.00	0.00	0.67	0.004

AB – antibiotika, AM – ampicilīns, CIP – ciprofloksacīns, CTX – cefotaksīms, CZ – cefazolīns, IMP – imipenēms, GM – gentamicīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, C – hloramfenikols, TE – tetraciklīns, ENO – enrofloksacīns.

No mazajām saimniecībām, augstu rezistences līmeni pret tetraciklīnu novērojām saimniecībā S3 (29.27%), bet vidēji augstu pret ampicilīnu (saimniecībā S1 un S2, attiecīgi 15.00% un 13.04%).

Salīdzinot izolēto *E. coli* antimikrobiālo **rezistenci pret katru no antibiotikām dažāda vecuma cūkām un sivēnmātēm**, redzam, ka tikai pret trim antibiotikām – ciprofloksacīnu, cefotaksīmu un imipenēmu, nepastāv būtiskas atšķirības atkarībā no cūku vecuma vai fizioloģiskā stāvokļa (3.5. tabula). Visbiežāk pret antibiotikām rezistentos *E. coli* izolēja no 4 līdz 12 nedēļu veciem sivēniem un jauncūkām, visretāk – 20 nedēļu vecām nobarojamajām cūkām. Visaugstākais rezistences izplatības līmenis pret tetraciklīnu (66.36%), sulfametoksazolu-trimetoprimu (40.00%), trimetoprimu (37.27%), hloramfenikolu (25.45%), gentamicīnu (10.91%) un enrofloksacīnu (7.27%) tika novērots četrus nedēļu veciem sivēniem. Pret ampicilīnu (42.53%), amoksicilīnu-klavulānskābi (32.18%) un cefazolīnu (11.49%) rezistentos *E. coli* visbiežāk izolēja no 12 nedēļu vecām jauncūkām. Sivēnmātēm rezistences līmenis izolētajiem *E. coli* bija būtiski zemāks pret ampicilīnu (15.58%) un amoksicilīnu – klavulānskābi (6.49%) salīdzinot ar četrus līdz 12 nedēļu vecām cūkām, taču līdzvērtīgi bieži rezistentu *E. coli* izolēja pret tādām antibiotikām kā gentamicīns (7.79%), trimetoprimis (22.08%), tetraciklīns (40.26%) un hloramfenikols (11.69%).

3.5. tabula

Pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatība (%) dažāda vecuma cūkām

Antibiotika, pret kuru ir identificēta rezistence	Rezistentu <i>E. coli</i> izplatība, %						p vērtība
	Cūku vecums, nedēļās, (n)					Sivēnmātes (n=77)	
	4 (n=110)	6 (n=151)	8 (n=105)	12 (n=87)	20 (n=85)		
AM	38.18 ^a	35.76 ^a	38.10 ^a	42.53 ^a	14.12 ^b	15.58 ^b	<0.001
CIP	7.27	1.99	4.76	4.60	1.17	1.30	0.104
CTX	0.91	3.97	0.95	1.15	0.00	0.00	0.128
CZ	0.91 ^b	6.62 ^b	3.81 ^b	11.49 ^a	2.35 ^b	1.30 ^b	0.004
IMP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.000
GM	10.91 ^a	2.65 ^{bc}	7.61 ^{ab}	5.75 ^{ab}	0.00 ^c	7.79 ^{ab}	0.010
AMC	30.00 ^{ab}	17.22 ^{ab}	29.52 ^{ab}	32.18 ^a	16.47 ^{bc}	6.49 ^c	<0.001
SXT	40.00 ^a	21.19 ^b	26.67 ^{ab}	21.84 ^b	1.18 ^c	18.18 ^b	<0.001
TMP	37.27 ^a	21.19 ^a	30.48 ^a	26.44 ^a	3.53 ^b	22.08 ^a	<0.001
C	25.45 ^a	2.65 ^c	15.24 ^{ab}	20.69 ^{ab}	3.53 ^{bc}	11.69 ^b	<0.001
TE	66.36 ^a	58.28 ^{ab}	58.10 ^{ab}	65.52 ^a	30.59 ^c	40.26 ^{bc}	<0.001
ENO	7.27 ^a	0.66 ^b	3.81 ^{ab}	1.15 ^{ab}	0.00 ^b	2.60 ^{ab}	0.012

AM – ampicilīns, CIP – ciprofloksacīns, CTX – cefotaksīms, CZ – cefazolīns, IMP – imipenēms, GM – gentamicīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, C – hloramfenikols, TE – tetraciklīns, ENO – enrofloksacīns; ^{a, b, c} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas (p<0.05).

Lielajās saimniecībās 42.37% (n = 197) no izolētajiem *E. coli* tika novērota rezistence pret vismaz trīs antibiotiku klasēm, taču mazajās saimniecībās – tikai 2.00% (n=3) no izolētajiem *E. coli* tika klasificēti kā multirezistenti (3.6. tabula). Turklāt 27.92% (n=55) no izolētajiem multirezistentajiem *E. coli* lielajās saimniecībās novērojām rezistenci pret piecām un vairāk antibiotiku klasēm.

3.6. tabula

Atšķirīga rezistences līmeņa un multirezistento (MDR) *E. coli* izplatība (% , (n)) lielajās un mazajās saimniecībās

Antimikrobiālo līdzekļu kategoriju skaits (Magiorakos et al., 2012), pret kurām ir identificēta rezistence	Lielajās saimniecībās, (n=465)	Mazajās saimniecībās, (n=150)
0	23.01 (107)	71.33 (107)
1	24.73 (115)	22.00 (33)
2	9.46 (44)	4.67 (7)
3	22.37 (104)	2.00 (3)
4	8.60 (40)	0.00 (0)
5	7.31 (34)	0.00 (0)
6	3.44 (16)	0.00 (0)
7	0.86 (4)	0.00 (0)
8	0.22 (1)	0.00 (0)
Kopā MDR <i>E. coli</i> (≥3)	42.80 (199)	2.00 (3)

MDR *E. coli* – multirezistentie *E. coli*.

Starp dažāda vecuma cūku grupām, augsts multirezistento *E. coli* izplatības līmenis (36.42-47.27%) tika novērots 4 līdz 12 nedēļu veciem sivēniem un jauncūkām. Vismācākais izplatības līmenis bija 20 nedēļu vecām nobarojamajām cūkām (11.76%), bet sivēnmātēm – 14.29% (3.7. tabula). Taču jāuzsver, ka 63.64% no sivēnmātēm izolētie multirezistentie *E. coli* uzrādīja rezistenci pret piecām un vairāk antibiotiku klasēm. Nobarojamajām cūkām tik plaša rezistences spektra *E. coli* izolātiem netika konstatēti, bet četru, astoņu un 12 nedēļu veciem sivēniem to īpatsvars sasniedza 30.77 līdz 35.90%.

3.7. tabula

Atšķirīga rezistences līmeņa un multirezistento (MDR) *E. coli* izplatība (% , (n)) dažāda vecuma cūkām

Antimikrobiālo līdzekļu kategoriju skaits (Magiorakos et al., 2012), pret kurām ir identificēta rezistence	Cūku vecums, nedēļās					Sivēnmātes (n=77)
	4 (n=110)	6 (n=151)	8 (n=105)	12 (n=87)	20 (n=85)	
0	20.91 (23)	34.44 (52)	28.57 (30)	21.84 (19)	61.17 (52)	49.35 (38)
1	24.55 (27)	22.52 (34)	23.81(25)	27.59 (24)	21.18 (18)	25.97 (20)
2	7.27 (8)	6.62 (10)	10.48 (11)	10.34 (6)	5.88 (5)	10.39 (8)
3	21.82 (24)	27.15 (41)	18.10 (19)	16.09 (9)	7.06 (6)	3.90 (3)
4	10.91 (12)	6.62 (10)	5.71 (6)	8.05 (14)	4.71 (4)	1.30 (1)
5	8.18 (9)	2.65 (4)	7.62 (8)	9.20 (7)	0.00 (0)	6.49 (5)
6	4.55 (5)	0.00 (0)	4.76 (5)	5.74 (8)	0.00 (0)	1.30 (1)
7	1.81 (2)	0.00 (0)	0.00 (0)	1.15 (5)	0.00 (0)	1.30 (1)
8	0.00 (0)	0.00 (0)	0.95 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
Kopā MDR <i>E. coli</i>	47.27(52)	36.42 (55)	37.14 (39)	40.23 (35)	11.76 (10)	14.29 (11)

MDR *E. coli* – multirezistentie *E. coli*.

3.1.3. ESBL producējošo *E. coli* sastopamība pētījumā iekļautajās saimniecībās dažāda vecuma cūkām, tā antimikrobiālā rezistence

Izmeklējot 615 cūku fekāliju paraugus no septiņām cūkkopības saimniecībām, ESBL producējošo *E. coli* klātbūtni konstatējām 144 paraugos (23.4%) četrās (L1, L2, L3 un S1) cūkkopības saimniecībās.

Starp lielajām saimniecībām, visaugstāko ESBL producējošā *E. coli* sastopamības līmeni novērojām saimniecībā L1 (64.3%), taču no mazajām saimniecībām tā klātbūtni konstatējām tikai saimniecībā S1, kur pozitīvo paraugu skaits sasniedza 47.5%. Kopumā vērtējot ESBL producējošā *E. coli* sastopamības biežumu starp lielo un mazo saimniecību grupām, tas būtiski atšķirās. Būtiski biežāk ($p = 0.029$) ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni konstatējām lielajās saimniecībās (26.9%), savukārt retāk – mazajās cūkkopības saimniecībās (12.7%). Taču tai pašā laikā jāuzsver, ka ESBL producējošā *E. coli* sastopamības biežums būtiski atšķirās savstarpēji starp fermām gan lielo, gan mazo saimniecību grupās (3.8. tabula).

Izvērtējot ESBL producējošo *E. coli* izplatību dažāda vecuma un fizioloģiskā stāvokļa cūkām, ievērojami augstāku tā izplatību novērojām četru un sešu nedēļu veciem sivēniem (28.3% un 35.1%) un sivēnmātēm (41.6%), savukārt zemāku ESBL producējošā *E. coli* izplatību novērojām 20 nedēļu vecām nobarojamām cūkām (8.2%) (3.9. tabula).

3.8. tabula

ESBL producējošu *E. coli* sastopamība (% (n)) lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās

Atkarībā no saimniecības lieluma:		Sastopamība, % (n)
Lielās (n=465)	L1 (n=115)	64.3 ^a (74)
	L2 (n=127)	29.9 ^b (38)
	L3 (n=121)	10.7 ^c (13)
	L4 (n=102)	0
Mazās (n=150)	S1 (n=40)	47.5 ^a (19)
	S3 (n=41)	0
	S2 (n=69)	0

a, b, c, – vidējās vērtības vienā kolonnā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ($p < 0.05$).

3.9. tabula

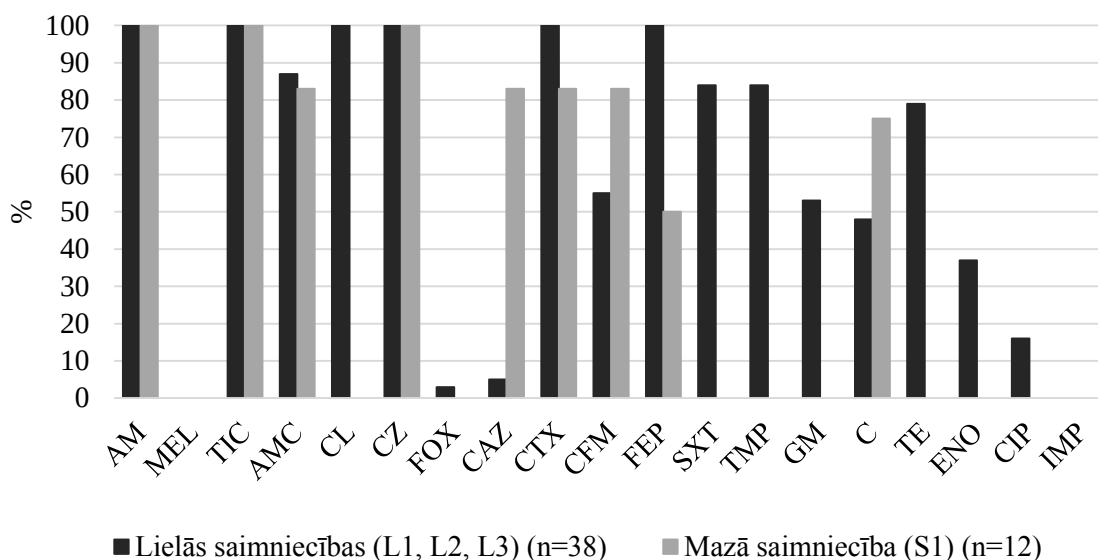
ESBL producējošu *E. coli* sastopamība (% (n)) dažāda vecuma cūkām

Atkarībā no cūku vecuma:		Sastopamība, % (n)
Cūku vecums nedēļās (n=538)	4 (n=110)	28.2 ^a (31)
	6 (n=151)	35.1 ^a (53)
	8 (n=105)	10.5 ^b (11)
	12 (n=87)	11.5 ^b (10)
	20 (n=85)	8.2 ^b (7)
Sivēnmātes (n=77)		41.6 ^a (32)

a, b, – vidējās vērtības vienā kolonnā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ($p < 0.05$).

Gan lielajās, gan mazajās saimniecībās visi izolētie ESBL producējošie *E. coli* bija rezistenti pret ampicilīnu, tikarcilīnu un cefazolīnu. Turklāt lielajās saimniecībās visiem izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* novērojām rezistenci pret cefaleksīnu, cefotaksīmu un cefepīmu. Vairums ESBL producējošie *E. coli*, kas izolēti no lielajām saimniecībām, bija rezistenti pret amoksicilīnu-klavulānskābi (87%), trimetoprimu (84%), sulfametaksazolu-trimetoprimu (84%), tetraciklīnu (79%) un gentamicīnu (53%). Mazajā saimniecībā (S1) izolētie ESBL producējošie *E. coli* bieži bija rezistenti pret ceftazidīmu (83%), cefotaksīmu (83%), cefiksīmu (83%), hloramfenikolu (75%) un cefepīmu (50%) (3.1. attēls). Lielajās

saimniecībās statistiski būtiski ($p < 0.05$) biežāk izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* novērojām rezistenci pret cefaleksīnu, cefepīmu, trimetoprimu, sulfametaksazolu-trimetoprimu, gentamicīnu, tetraciklīnu, enrofloksacīnu, savukārt mazajā saimniecībā (S1) būtiski biežāk izolētie ESBL producējošie *E. coli* bija rezistenti pret ceftazidīmu. Jāuzsver, ka nevienam no izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* novērojām rezistenci pret mecilīnu un imipenēmu.

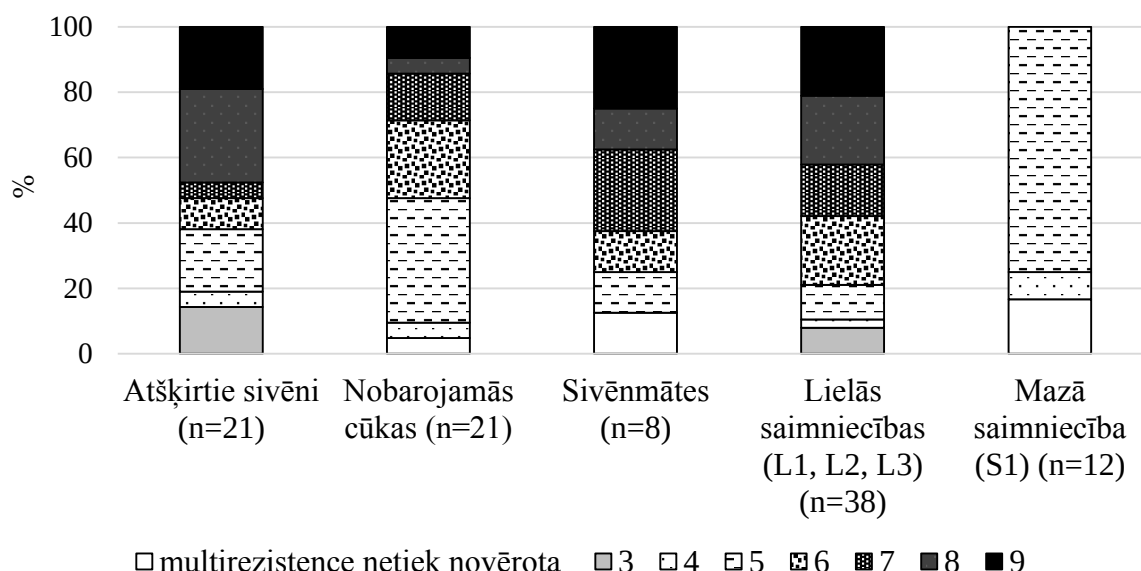


3.1. att. Antibiotiku rezistences izplatība (%) izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* lielo un mazo cūku saimniecību grupās

AM – ampicilīns, MEL – mecilīns, TIC – tikarcilīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, CL – cefaleksīns, CZ – cefazolīns, FOX – cefoksitīns, CAZ – ceftazidīms, CTX – cefotaksīms, CFM – cefiksīms, FEP – cefepīms, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, GM – gentamicīns, C – hloramfenikols, TE – tetraciklīns, ENO – enrofloksacīns, CIP – ciprofloksacīns, IMP – imipenēms.

Pētījumā no izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* 96% (n=48) tika klasificēti kā multirezistenti. Lielai daļai ESBL producējošu *E. coli*, kas izolēti no 4, 6 un 12 nedēļu vecu sīvēnu apvienotās grupas (47.6%) un sīvēnmātēm (37.5%), novēroja rezistenci pret astoņām un vairāk antibiotiku klasēm, bet būtiski zemāka sastopamība bija attiecīgi 12 un 20 nedēļu vecu cūku apvienotajā grupā (14.2%) (3.2. attēls).

Visi no lielajām saimniecībām izolētie ESBL producējošie *E. coli* tika klasificēti kā multirezistenti, bet 16.7% no mazajās saimniecībās izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* multirezistence netika novērota. Tāpat, no lielajām saimniecībām izolētie ESBL producējošie *E. coli* uzrādīja plašākus multirezistences fenotipus: 79% no lielajās saimniecībās izolētajiem ESBL producējošiem *E. coli* novēroja rezistenci pret sešām un vairāk antibiotiku klasēm, kamēr 75% no mazajā saimniecībā izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* novēroja rezistenci pret piecām antibiotiku klasēm, taču tai pašā laikā – neviens no tiem neuzrādīja rezistenci pret sešām un vairāk antibiotiku klasēm (3.2. attēls).

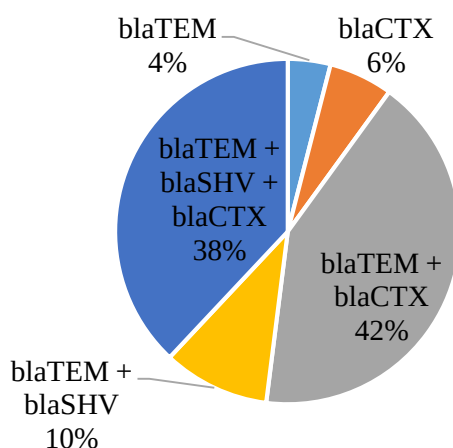


3.2. att. Multirezistences līmeņu sadalījums (%) ESBL producējošiem *E. coli*, izolētiem no dažāda vecuma cūkām un saimniecībām

3.1.4. ESBL producējošo *E. coli* kodējošie gēni, sastopamības atšķirības lielajās un mazajās cūkkopības saimniecībās

Visos fenotipiski apstiprinātajos ESBL producējošajos *E. coli* konstatējām vismaz vienu ESBL kodējošo gēnu, kas apstiprina, ka mūsu izolētie *E. coli* spēj ražot ESBL enzīmus. Visbiežāk konstatētais ESBL kodējošais gēns bija *bla*_{TEM} (94%; n=47), tad sekoja *bla*_{CTX-M} (86%, n=43) un *bla*_{SHV} (48%, n=24).

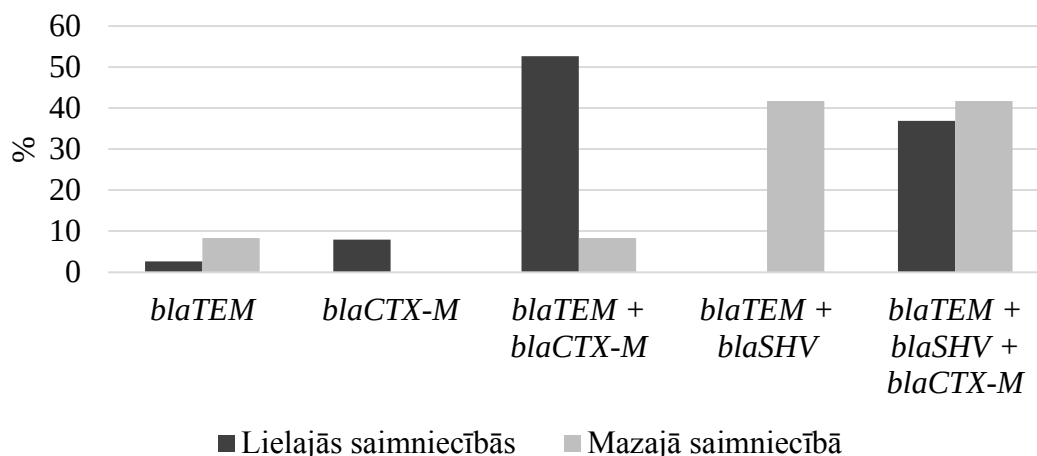
Vairumam 45 no 50 (90%) ESBL producējošo *E. coli* bēta-laktamāzi kodējošos gēnus novērojām divu vai vairāku gēnu kombinācijās. Visbiežāk novērotā kombinācija bija *bla*_{TEM} un *bla*_{CTX-M} 21 (42%) gadījumos, kam sekoja *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} un *bla*_{CTX-M} 19 gadījumos (36%) un *bla*_{TEM} un *bla*_{SHV} 5 gadījumos (10%) (3.3. attēls).



3.3. att. ESBL kodējošo gēnu un to kombinācijas sadalījums (%) izolētajos ESBL producējošos *E. coli* cūku populācijā

Mazajā saimniecībā (S1) bēta-laktamāzes kodējošā gēna *bla*_{SHV} klātbūtni, kopā ar citiem *bla* kodējošajiem gēniem, konstatējām ievērojami biežāk nekā lielajās saimniecībās (83.3% pret 36.8%, p=0.007), savukārt *bla*_{CTX-M} kodējošā gēna klātbūtni ievērojami biežāk novērojām lielajās saimniecībās (97.4% pret 50.0%, p<0.001). Lielajās saimniecībās visizplatītākās bēta-

laktamāzes kodējošo gēnu kombinācijas bija *bla*_{TEM} un *bla*_{CTX-M} (52.6%, n=20), bet mazajās saimniecībās – *bla*_{TEM} un *bla*_{SHV} (41.7%, n=5) (3.4. attēls)



3.4. att. ESBL kodējošo gēnu sadalījums (%) izolētajiem *E. coli* lielajās un mazajā cūkkopības saimniecībās

Lielajās saimniecībās visbiežāk novērotais bēta-laktāma antibiotiku rezistences fenotips bija AM-TIC-AMC-CL-CZ-CTX-CFM-FEP (45%, n=17), kurš vairumā gadījumu saturēja visus trīs *bla* genus – *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} un *bla*_{CTX-M} (52.9%, n=9) vai *bla*_{TEM} un *bla*_{CTX-M} gēnu kombināciju (35.3%, n=6). Sekojoši izplatītākais bēta-laktāma antibiotiku rezistences fenotips bija AM-TIC-AMC-CL-CZ-CTX-FEP (34%, n=13), kurš visbiežāk saturēja *bla*_{TEM} un *bla*_{CTX-M} gēnu kombināciju (61.5%, n=8).

Mazajā saimniecībā visizplatītākais bēta-laktāma antibiotiku rezistences fenotips bija AM-TIC-AMC-CZ-CAZ-CTX-CFM-FEP (50%, n=6), kas biežāk (66.7%, n=4) saturēja *bla*_{TEM} un *bla*_{SHV} kodējošo gēnu kombināciju. Jāuzsver, ka fenotips AM-TIC-CZ tika novērots divos gadījumos, viens no tiem saturēja *bla*_{TEM}, bet otrs – visus trīs *bla* gēnus, t.i., *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} un *bla*_{CTX-M} (3.10. tabula).

Bēta-laktamāzes gēns *bla*_{SHV} uzrādīja pozitīvu asociāciju ar rezistenci pret amoksicilīnu-klavulānskābi (OR=6.79, 95% CI 1.39-66.10, p=0.0083), pret ceftazidīmu (OR=8.38, 95% CI 2.47-37.17; p=0.0001) un cefiksīmu (OR=4.36, 95% CI 1.70-12.00; p=0.0009). Gēns *bla*_{CTX-M} uzrādīja pozitīvu asociāciju ar rezistenci pret cefaleksīnu (OR=34.86, 95% CI 6.63-357.80; p=0.0001) un pozitīvu asociāciju (p<0.05) ar rezistenci pret vairākām ne-bēta-laktāma antibiotikām – sulfametoksazolu-trimetoprimu, trimetoprimu, gentamicīnu, tetraciklīnu un enrofloksacīnu (3.11. tabula). Netika novērota statistiski nozīmīga asociācija starp *bla*_{TEM} kodējošā gēna klātbūtni un fenotipiski konstatēto antimikrobiālo rezistenci pret antibiotikām.

3.10. tabula

Izolēto ESBL producējošo *E. coli* bēta-laktāmu rezistences fenotipu un kodēto ESBL gēnu sadalījuma biežums, n

Rezistences fenotips pret bēta-laktāmu antibiotikām	ESBL kodējošie gēni						
	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{TEM+} <i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM+} <i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM+} <i>bla</i> _{SHV+} <i>bla</i> _{CTX-M}	Kopā:
Lielajā saimniecībā (L1, L2, L3)							
AM-TIC-AMC-CL-CZ-CAZ-CTX-CFM-FEP	0	0	0	0	1	1	2
AM-TIC-AMC-CL-CZ-CTX-CFM-FEP	1	0	1	0	6	9	17
AM-TIC-AMC-CL-CZ-CTX-FEP	1	0	0	0	8	4	13
AM-TIC-AMC-CL-CZ-FOX-CTX-CFM-FEP	1	0	0	0	0	0	1
AM-TIC-CL-CZ-CTX-CFM-FEP	0	0	0	0	1	0	1
AM-TIC-CL-CZ-CTX-FEP	0	0	0	0	4	0	4
Mazajā saimniecībā (S1)							
AM-TIC-AMC-CZ-CAZ-CTX-CFM	0	0	0	1	0	3	4
AM-TIC-AMC-CZ-CAZ-CTX-CFM-FEP	0	0	0	4	1	1	6
AM-TIC-CZ	0	0	1	0	0	1	2
Kopā:	3	0	2	5	21	19	50

AM – ampicilīns, TIC – tikarcilīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, CL – cefaleksīns, CZ – cefazolīns, FOX – cefoksitīns, CAZ – ceftazidīms, CTX – cefotaksīms, CFM – cefiksīms, FEP – cefepīms.

3.11. tabula

Statistiski nozīmīgas asociācijas starp ESBL kodējošiem gēniem un fenotipiski konstatēto antibiotiku rezistenci ESBL producējošiem *E. coli* izolātiem

ESBL gēns	Rezistence pret antibiotiku	OR	95% CI	p vērtība
<i>bla</i> _{SHV}	AMC	6.79	1.39 – 66.10	0.0083
	CL	0.12	0.03 – 0.41	0.0001
	CAZ	8.38	2.47 – 37.17	0.0001
	CFM	4.36	1.70 – 12.00	0.0009
	FEP	0.15	0.01 – 0.79	0.0124
	SXT	0.30	0.12 – 0.77	0.0067
	TMP	0.30	0.12 – 0.77	0.0067
<i>bla</i> _{CTX-M}	CL	34.86	6.63 – 357.80	0.0001
	CTX	6.77	0.45 – 101.68	0.0931
	CAZ	0.08	0.01 – 0.33	0.0001
	SXT	15.03	3.02 – 148.12	0.0001
	TMP	15.03	3.02 – 148.12	0.0001
	GM	inf	2.90 – inf	0.0003
	TE	12.11	2.45 – 118.82	0.0003
	ENO	inf	1.46 – inf	0.0093

AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, CL – cefaleksīns, CAZ – ceftazidīms, CFM – cefiksīms, FEP – cefepīms, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, CTX – cefotaksīms, GM – gentamicīns, TE – tetraciklīns, ENO – enrofloksacīns, OR – izredzes attiecība, 95% CI – 95% ticamības intervāls, inf – bezgalība.

3.2. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas izbarošanas ietekme uz sivēnu veselības stāvokli un gremošanas trakta attīstību

3.2.1. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas ietekme uz hematoloģiskajiem un seruma bioķīmiskajiem rādītājiem

Lai izvērtētu vispārējo sivēnu veselības stāvokli pirms un pēc pētījuma, ieguvām un izvērtējām hematoloģiskos un atsevišķus seruma bioķīmiskos rādītājus. Uzsākot pētījumu (14.diena), kā arī pētījuma noslēgumā (56. diena) visi hematoloģiskie un seruma bioķīmiskie rādītāji iekļāvās sivēnu vecumam atbilstošajās normu robežās, izņemot ALP (sārmainā fosfatāze), kas, uzsākot pētījumu, svārstījās no $906.6\text{--}1771.8\text{ U L}^{-1}$, bet pētījuma beigās normas robežas pārsniedza P, H un C grupās, attiecīgi par 1.0%, 1.5% un 11.9%. Pētījuma noslēgumā, salīdzinot ar kontroles grupu, eritrocītu skaits bija zemāks ($p<0.05$) H grupai, bet ASAT līmenis bija zemāks P grupai ($p<0.05$) un PB grupai ($p>0.05$). Kalcija koncentrācija serumā bija būtiski zemāka PB un H grupām, salīdzinot ar C un P grupām (3.12. tabula).

3.12. tabula

Barības komponentu ietekme uz hematoloģiskajiem un seruma bioķīmiskajiem rādītājiem noslēdzot sivēnu ēdināšanas pētījumu (56. diena), $\bar{x}\pm\text{SE}$

Rādītājs	C grupa	P grupa	PB grupa	H grupa
WBC 10^9 L^{-1}	23.780±0.530	24.373±1.175	21.336±1.360	22.600±1.274
GRAN 10^9 L^{-1}	9.740±0.464	11.027±0.949	8.664±0.703	9.664±0.625
LYM 10^9 L^{-1}	11.900±0.539	11.055±0.447	10.936±0.720	11.064±0.666
RBC 10^{12} L^{-1}	6.712±0.159 ^a	6.670±0.107 ^a	6.995±0.095 ^a	6.288±0.120 ^b
HCT %	34.900±0.460	35.418±0.641	35.145±0.757	33.818±0.627
HGB g dL ⁻¹	10.960±0.147	10.882±0.133	10.927±0.201	10.418±0.195
MCV fl	52.040±0.830 ^{a,b}	53.112±0.772 ^a	50.218±0.201 ^b	53.827±0.754 ^a
MCH pg	16.320±0.252 ^a	16.327±0.141 ^a	15.628±0.220 ^b	16.618±0.192 ^a
MCHC g dL ⁻¹	31.400±0.145	30.818±0.270	31.145±0.142	30.864±0.192
ASAT U L ⁻¹	75.240±8.367 ^a	48.009±4.606 ^b	60.018±3.306 ^{a,b}	68.373±6.707 ^a
ALP U L ⁻¹	335.560±36.074 ^a ↑	304.381±1.029 ^a ↑	260.327±7.018 ^b	303.082±10.044 ^a ↑
Ca mmol L ⁻¹	2.928±0.068 ^a	2.918±0.036 ^a	2.728±0.031 ^b	2.756±0.053 ^b
P mmol L ⁻¹	2.890±0.059	2.810±0.064	2.975±0.028	2.871±0.044
GGT U L ⁻¹	45.200±2.172	49.345±8.201	37.682±2.670	46.009±2.487
GLU mmol L ⁻¹	4.560±0.093	4.832±0.241	4.665±0.119	4.715±0.139

WBC – leukocītu skaits, GRAN – granulocītu skaits, LYM – limfocītu skaits, RBC – eritrocītu skaits, HCT – hematokrits, HGB – hemoglobīns, MCV – vidējais eritrocītu tilpums, MCH – vidējais hemoglobīna saturs eritrocītā, MCHC – vidējā hemoglobīna koncentrācija eritrocītos, ASAT – aspartātaamīnotransferāze, ALP – sārmainā fosfatāze, Ca – kalcījs, P – fosfors, GGT – γ -glutamīltransferāze, GLU – glikoze. ↑ – līmenis ir augstāks nekā atsaucies intervāls (Klem et al., 2009), ^{a, b} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ($p<0.05$).

3.2.2. Barības komponentu ietekme uz fekāliju un zarnu satura mikrobiotu un pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatību

Pētījuma sākumā, 14. sivēnu dzīves dienā, nenovērojām būtiskas *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju un *E. coli* skaita atšķirības fekālijās starp pētījumā ietvertajām grupām. Sivēnu 35. dzīves dienā, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaits bija zemāks ($p<0.05$) P grupā, salīdzinot ar C grupu, taču sivēnu 56. dzīves dienā, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju un *E. coli* skaits būtiski zemāks tika novērots H grupā, salīdzinot ar C grupu (3.13. tabula). Jāuzsver, ka 56. dzīves dienā, PB grupas sivēnu fekālijās novērojām zemāku *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju ($p<0.05$) un *E. coli* skaitu ($p>0.05$), salīdzinot ar P grupu.

Barības komponentu ietekme uz *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju un *E. coli* skaitu fekālijās 14., 35. un 56. sivēnu dzīves dienā, $\bar{x} \pm SE$

Mikrobiotas rādītājs ($\log_{10}$ kvv g^{-1})	C grupa	P grupa	PB grupa	H grupa
fekālijās 14.d:				
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.48±0.30	3.69±0.30	3.15±0.89	3.88±0.47
<i>E. coli</i>	3.21±0.44	3.16±0.43	2.86±0.69	3.56±0.54
fekālijās 35.d:				
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.37±0.47 ^a	1.73±0.38 ^b	2.78±0.43 ^{a,b}	2.95±0.47 ^{a,b}
<i>E. coli</i>	2.91±0.29	1.66 ± 0.38	2.05 ± 0.35	2.92 ± 0.44
fekālijās 56.d:				
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.19±0.70 ^{a,b}	5.41±0.23 ^a	3.93±0.52 ^{b,c}	3.18±0.37 ^c
<i>E. coli</i>	4.94±0.60 ^a	5.02±0.22 ^a	3.85±0.49 ^{a,b}	3.16±0.33 ^b

^{a, b, c} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ($p < 0.05$).

Vērtējot tievās un resnās zarnas satura mikrobiotas izmaiņas, atkarībā no dažādu barības komponentu iekļaušanas sivēnu barības devā, konstatējām, ka iekļaujot probiotikas, būtiski palielinājās *Lactobacillus* spp. skaits tievās zarnas ($p < 0.05$) un resnās zarnas saturā, salīdzinot ar H un C grupām (3.14. tabula). Augu piedevai bija tendence ($p = 0.064$) samazināt *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu resno zarnu saturā salīdzinot ar kontroles grupu, tāpat H grupas tievo un resno zarnu saturā novērojām viszemāko *E. coli* skaitu, taču samazinājums nebija statistiski nozīmīgs.

Barības komponentu ietekme uz *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* un *Lactobacillus* spp. skaitu tievās un resnās zarnas saturā, $\bar{x} \pm SE$

Lokalizācija un mikrobiotas rādītājs (log ₁₀ kvv g ⁻¹)	Grupa				p vērtība
	C	P	PB	H	
jejunum					
Enterobacteriaceae	5.29±2.690	3.92±0.563	3.04±0.850	2.99±0.671	0.4703
Escherichia coli	4.74±2.210	3.54±0.457	3.96±0.826	2.99±0.670	0.5938
Lactobacillus spp.	6.27±0.815 ^b	7.75±0.242 ^a	6.62±0.140 ^{ab}	5.98±0.511 ^b	0.0354
colon					
Enterobacteriaceae	5.80±0.804 ^x	5.57±0.290 ^{xy}	4.00±1.043 ^{xy}	3.55±0.279 ^y	0.0937
Escherichia coli	4.86±0.613	5.21±0.256	3.88±0.989	3.51±0.293	0.2136
Lactobacillus spp.	6.48±0.265 ^y	7.99±0.031 ^x	7.12±0.417 ^{xy}	7.12±0.375 ^{xy}	0.0842

^{a, b} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras ($p < 0.05$); ^{x, y} – vidējām vērtībām vienā rindā ar dažādiem burtiem ir tendence atšķirties ($0.05 < p \leq 0.10$).

Izolēto *E. coli* antimikrobiālā rezistence. Izmeklējot 46 fekāliju paraugus no 14 un 56 dienu veciem sivēniem, ESBL producējošo *E. coli* klātbūtne netika konstatēta nevienā no paraugiem. Lai raksturotu ietekmi uz rezistentā *E. coli* izplatību sivēniem pirms un pēc barības komponentu izēdināšanas, pētījuma laikā analizējām 80 *E. coli*, izolētus no 14 (pirms pētījuma uzsākšanas) un 56 (pētījuma noslēgumā) dienu veciem sivēniem. Pirms pētījuma izolētajiem *E. coli* novērojām biežāk rezistenci pret ampicilīnu (42%) un trimetoprimu (33%). Pētījuma noslēgumā biežāk rezistence tika novērota pret tetraciklīnu P grupā (50%), PB (50%) un H (44%) un pret trimetoprimu – P (50%) un PB (44%) grupās. Rezistence pret hloramfenikolu (38%) un cefotaksīmu (8%) tika novērota tikai kontroles grupā (3.15. tabula). Pētījuma noslēgumā, salīdzinot no pētnieciskajām grupām izolēto rezistentu *E. coli* fenotipisko dažādību, visvairāk variācijas tika novērotas C grupā (7 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret

8 antibiotikām), kam sekoja P grupa (6 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret 6 antibiotikām) un viszemākā – PB un H grupās (4 dažādi fenotipi, rezistence kopumā pret 5 antibiotiku veidiem) (3.16. tabula).

3.15. tabula

Antibiotiku rezistentā *E. coli* sastopamība sivēniem pirms un pēc sivēnu ēdināšanas pētījuma, n, (%)

Antibiotikas, pret kuru ir identificēta rezistence	14 dienu veciem sivēniem (n=12)	56 dienu veciem sivēniem			
		C grupa (n=16)	P grupa (n=20)	PB grupa (n=16)	H grupa (n=16)
Ampicilīns	5 (42%)	4 (25%)	5 (25%)	6 (38%)	5 (31%)
Amoksicilīns-klavulānskābe	0	2 (13%)	1 (5%)	0	0
Cefazolīns	0	1 (6%)	1 (5%)	3 (19%)	4 (25%)
Cefotaksīms	0	1 (6%)	0	0	0
Imipenēms	0	0	0	0	0
Gentamicīns	0	0	0	0	0
Tetraciklīns	2 (17%)	5 (31%)	10 (50%)	8 (50%)	7 (44%)
Ciprofloksacīns	0	0	0	0	0
Trimetoprimis	4 (33%)	4 (25%)	10 (50%)	7 (44%)	6 (38%)
Sulfametoksazols-trimetoprimis	1 (8%)	3 (19%)	9 (45%)	6 (38%)	5 (31%)
Hloramfenikols	0	6 (38%)	0	0	0
Enrofloksacīns	0	0	0	0	0

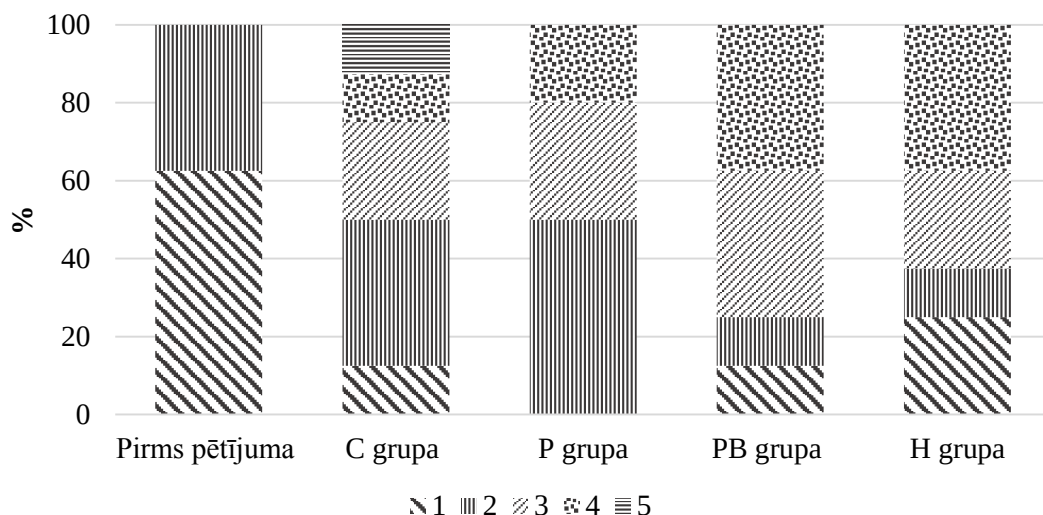
3.16. tabula

Izolēto rezistentu *E. coli* fenotipiskā dažādība (n) fekālijās 56 dienu veciem sivēniem

Grupa, n							
C		P		PB		H	
TE-SXT-TMP-C	1	AM-TE-SXT-TMP	3	AM-TE-SXT-TMP	3	AM-CZ-TE-SXT-TMP	3
TE-TMP-C	1	TE-SXT-TMP	3	AM-CZ-TE-SXT-TMP	3	AM-TE-SXT-TMP	2
AM-TE-SXT-TMP-C	1	TE-TMP	1	TE-TMP	1	TE-TMP	1
AM-TE-AMC-SXT-TMP-C	1	TE-SXT-TMP	1	TE	1	TE	1
TE-C	1	AM-CZ-TE-SXT-TMP	1				
AM-AMC	1	AM-TE-AMC-SXT-TMP	1				
AM-CTX-CZ	1						

AM – ampicilīns, CTX – cefotaksīms, CZ – cefazolīns, AMC – amoksicilīns-klavulānskābe, SXT – sulfametoksazols-trimetoprimis, TMP – trimetoprimis, C – hloramfenikols, TE – tetraciklīns.

No 14 dienu veciem sivēniem, 66.7% izolēto *E. coli* bija rezistenti pret vismaz vienu antibiotiku klasi, savukārt no 56 dienu veciem sivēniem – 50%. No 14 dienu vecu sivēnu fekālijām vairums izolētajiem rezistentajiem *E. coli* novēroja rezistenci tikai pret vienu antibiotiku klasi (62.5%), bet pētījuma beigās – vairumam no rezistentajiem *E. coli* bija raksturīga multirezistence, kas pētījuma grupās svārstījās no 50-75% (C – 50%, P – 50%, PB – 75% un H – 62.5%). *E. coli* rezistence pret 5 antibiotiku klasēm tika novērota tikai kontroles grupai (12.5%) (3.5. attēls).



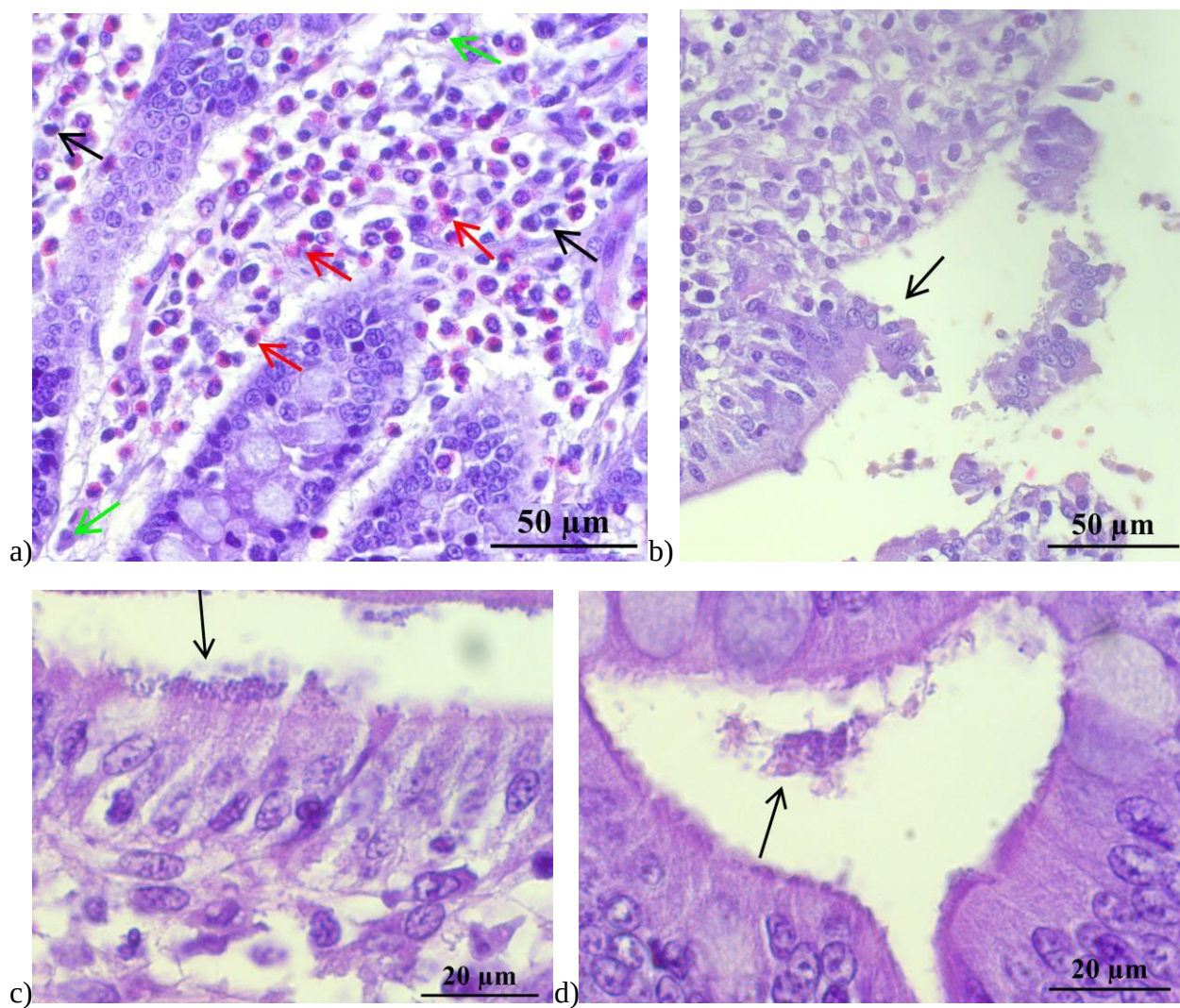
3.5. att. Rezistentā *E. coli* sadalījums (%) pa rezistences līmeņiem 14 dienu veciem sivēniem (pirms pētījuma) un 56 dienu veciem sivēniem (noslēdzot pētījumu) C, P, PB un H grupās

3.2.3. Tievo un resno zarnu histomorfoloģiskā analīze

Sivēniem visās pētnieciskajās grupās tika konstatēts viegls līdz mērens hronisks, difūzs enterokolīts ar vieglu līdz mērenu iekaisuma šūnu (eozinofilo leukocītu, limfocītu un plazmocītu) infiltrāciju. Vērtējot iekaisumu smaguma pakāpes, nekonstatējām būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, ne tievajā ($p=0.11$), ne resnajā ($p=0.12$) zarnā.

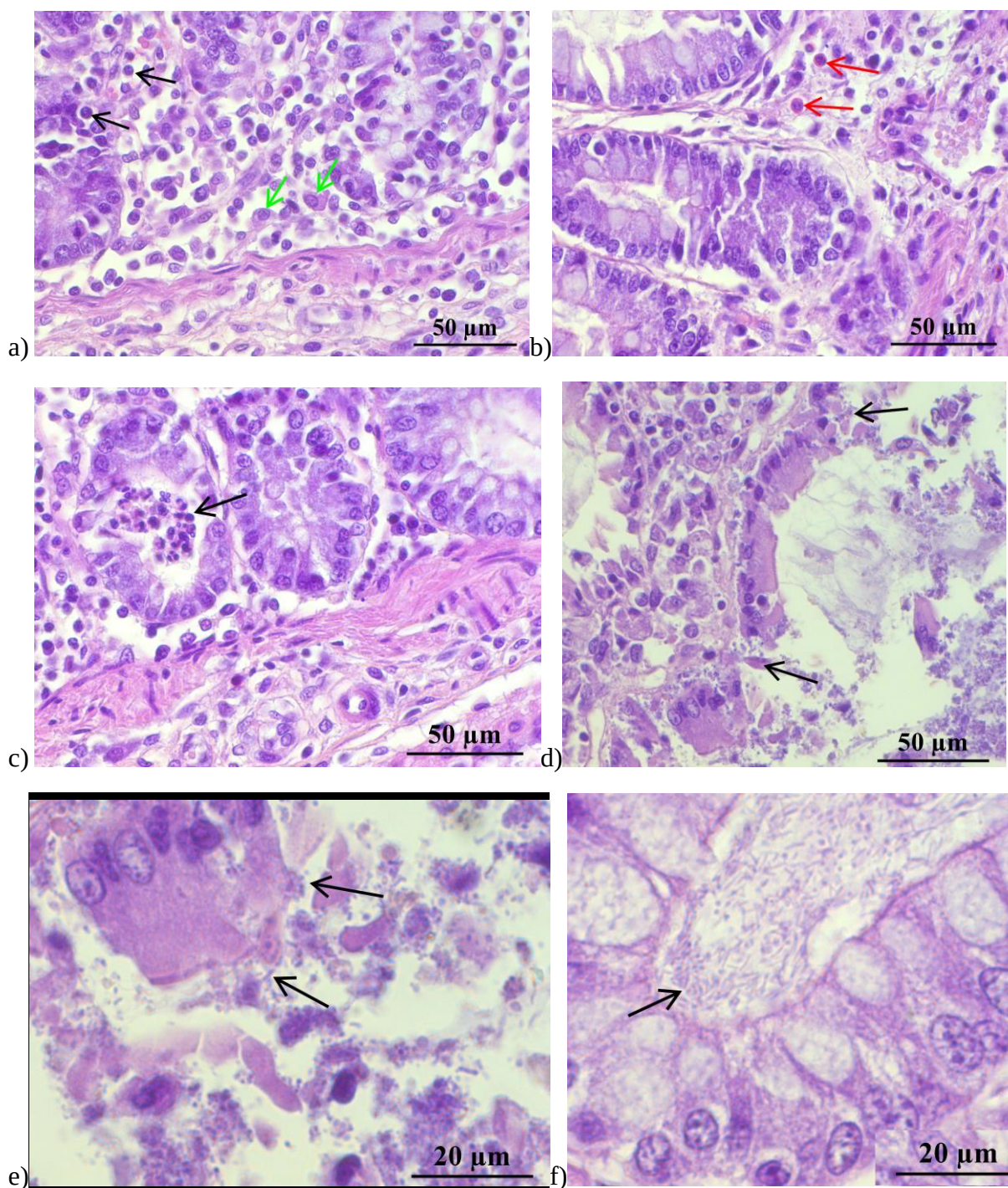
Vērtējot iekaisuma šūnu infiltrācijas pakāpi **tievās zarnas** gļotādas pamatkārtā (*lamina propria*), konstatējām mēreni daudz eozinofilo leukocītu, lai arī nebūtiski, tomēr vairāk grupās, kas saņēma pamatbarībai papildus probiotikas un/vai augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļas. Relatīvi maz līdz nedaudz novērojām plazmocītus un relatīvi nedaudz – limfocītus (3.6. attēls (a)). Eritrocītu, neitrofilo leukocītu un histiocītu infiltrāciju nenovērojām. Zarnu bārkstiņām novērojām vieglu līdz mērenu epitēlija šūnu deskvamāciju (3.6. attēls (b)). Tievās zarnas histoloģiskajos griezumos konstatējām mazā skaitā līdz nedaudz kokveida un nūjiņveida baktērijas, kas galvenokārt lokalizējās uz bārkstiņu virsmas (3.6. attēls (c)), un tikai diviem sivēniem tika konstatētas baktērijas kriptās (P un PB grupās) (3.6. attēls (d)).

Vērtējot iekaisuma šūnu infiltrāciju **resnās zarnas** gļotādas pamatkārtā (*lamina propria*), konstatējām relatīvi nedaudz plazmas šūnu, kā arī maz līdz nedaudz limfocītu infiltrāciju visu grupu sivēniem (3.7. attēls (a)). Atsevišķiem sivēniem, īpaši grupās, kas saņēma kādu no barības papildus komponentiem, novērojām vieglu eozinofilo leukocītu infiltrāciju kriptu apvidū (3.7. attēls (b)). Tāpat atsevišķiem sivēniem dažās resnās zarnas kriptās novēroja vieglu neitrofilo leukocītu infiltrāciju (3.7. attēls (c)). Visu grupu sivēnu resnās zarnas histoloģiskajos griezumos novērojām gļotādas virsējās daļas deskvamāciju (3.7. attēls (d)). Uz gļotādas virsmas novērojām nedaudz līdz mēreni daudz kokveida un nūjiņveida baktēriju (3.7. attēls (e)), taču kriptās, lai arī nebūtiski ($p=0.62$), tomēr biežāk tās konstatējām P grupas un PB grupas sivēniem (3.7. attēls (f)). Atsevišķiem sivēniem visās pētnieciskajās grupās nebūtiski ($p=0.19$), taču vairāk C un H grupās, konstatējām nelielu kriptosporīdiju invāziju dažās resnās zarnas kriptās.



3.6. att. Histoloģiskās atradnes 56 dienu vecu sivēnu tievās zarnas griezumos, H&E

- a) iekaisuma šūnu infiltrācija tievās zarnas (*jejunum*) gļotādas pamatkārtā, eozinofīlie leukocīti (sarkana bulta), plazmocīti (zaļa bulta), limfocīti (melna bulta), H gr., 400×; b) epitēlija šūnu deskvamācija tievās zarnas (*jejunum*) bārktīņu daļā, H gr., 400×; c) kokveida un nūjiņveida baktērijas uz tievās zarnas (*jejunum*) bārktīņu virsmas, P gr., 1000×; d) kokveida un nūjiņveida baktērijas tievās zarnas (*jejunum*) kriptās, P gr., 1000×.
(foto: D. Gāliņa)



3.7. att. Histoloģiskās atradnes 56 dienu vecu sivēnu resnās zarnas griezumus, H&E

- a) iekaisuma šūnu infiltrācija resnās zarnas (*colon*) gļotādas pamatkārtā, plazmocīti (zaļa bulta), limfocīti (melna bulta), P gr., 400×; b) eozinofīlo leukocītu infiltrācija resnās zarnas (*colon*) kriptu apvidū, P gr., 400×; c) neitrofilo leukocītu infiltrācija resnās zarnas (*colon*) kriptās, PB gr., 400×; d) epitēlija šūnu deskvamācija resnās zarnas (*colon*) gļotādas virsējā daļā, P gr., 400×; e) kokveida un nūjiņveida baktērijas uz resnās zarnas (*colon*) gļotādas virsmas, P gr., 1000×; f) kokveida un nūjiņveida baktērijas resnās zarnas (*colon*) kriptā, P gr., 1000×.

(foto: D. Gāliņa)

Zarnu histomorfoloģiskie mērījumi. Papildinot sivēnu pamatbarību ar probiotikām un augu izcelsmes sastāvdaļām, būtiski palielinājās zarnu bārktīņu augstums H grupā (+35%, $p<0.05$), P grupā (+17%, $p<0.05$) un PB grupā (+12%, $p<0.05$), salīdzinot ar C grupu, taču bārktīņu platums būtiski zemāks bija novērojams C grupai. Vērtējot tievās zarnas kriptu

dziļumu, nenovērojām būtiskas atšķirības starp grupām. Novērtējot VH:CD attiecību, būtiski augstāka tā tika konstatēta H, P un PB grupām. Resnajā zarnā, grupām P, PB un H konstatējām dziļākas kriptas ($p<0.05$), salīdzinot ar C grupu (3.17. tabula).

3.17. tabula

Barības komponentu ietekme uz tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas bārkstiņu un kriptu morfometriskajiem rādītājiem, $\bar{x}\pm SE$

Rādītājs	C grupa	P grupa	PB grupa	H grupa	p vērtība
<i>jejunum</i>					
VH, μm	357.37 $\pm$ 23.433 ^c	416.87 $\pm$ 9.805 ^b	400.79 $\pm$ 8.870 ^b	482.87 $\pm$ 14.956 ^a	<0.0001
VW, μm	146.75 $\pm$ 6.597 ^b	176.83 $\pm$ 6.555 ^a	168.64 $\pm$ 5.504 ^a	168.32 $\pm$ 5.672 ^a	0.0310
CD, μm	327.16 $\pm$ 21.484	306.03 $\pm$ 6.947	299.02 $\pm$ 7.942	290.51 $\pm$ 9.614	0.1625
VH:CD	1.12 $\pm$ 0.051 ^c	1.39 $\pm$ 0.042 ^b	1.38 $\pm$ 0.049 ^b	1.72 $\pm$ 0.068 ^a	<0.0001
<i>colon</i>					
CD, μm	461.31 $\pm$ 7.007 ^c	533.98 $\pm$ 10.857 ^a	525.90 $\pm$ 12.819 ^{ab}	498.58 $\pm$ 5.692 ^b	0.0002

VH – zarnu bārkstiņu augstums, VW – zarnu bārkstiņas platums, CD – zarnu kriptas dziļums, VH:CD – zarnu bārkstiņu augstuma (VH) un kriptu dziļuma (CD) attiecība, ^{a, b} – vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras ($p<0.05$).

Kausveida šūnas, to sekretētie mucīni. Zemāku ($p<0.05$) kausveida šūnu blīvumu novērojām H grupas tievās zarnas bārkstiņās, taču vidējais kausveida šūnu skaits būtiski neatšķiras no pārējām pētnieciskajām grupām. Turpretī probiotikas palielināja kausveida šūnu skaitu resnās zarnas kriptās, taču netika ietekmēts kausveida šūnu blīvums (3.18. tabula).

3.18. tabula

Barības komponentu ietekme uz kausveida šūnu skaitu un blīvumu tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas bārkstiņās un kriptās, $\bar{x}\pm SE$

Kausveida šūnu skaits un blīvums/lokālizācija	Grupa				p vertība
	C	P	PB	H	
<i>jejunum</i>					
GC n/bārkstiņā	9.05±0.809	10.88±0.714	9.98±0.481	9.55±0.491	0.2330
GC/bārkstiņas augstuma vienībās (μm)*	0.03±0.004 ^a	0.03±0.002 ^a	0.03±0.001 ^a	0.02±0.001 ^b	0.0042
GC n/kriptā	21.55±1.550	23.43±1.138	22.08±0.966	20.75±0.699	0.2761
GC/kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.07±0.007	0.08±0.004	0.08±0.004	0.08±0.003	0.8101
<i>colon</i>					
GC n/kriptā	34.90±1.610 ^b	38.38±1.118 ^a	35.30±1.222 ^{ab}	34.35±0.660 ^b	0.0394
GC/kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.08±0.004	0.07±0.002	0.07±0.002	0.07±0.003	0.2751

GC – kausveida šūnas, n – skaits, *kausveida šūnu skaits attiecībā uz bārkstiņu augstumu vai kriptu dziļumu ^{a, b} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem ir būtiski atšķirīgas ($p<0.05$), SE – standartkļūda.

Probiotiku iekļaušana sivēnu barības devā palielināja skābo mucīnu saturošo kausveida šūnu skaitu tievās zarnas bārkstiņās ($p<0.05$) un kriptās, bet augu piedeva samazināja ($p<0.05$) iepriekš minēto šūnu skaitu tievās zarnas kriptās.

Kontroles grupas sivēniem novērojām samazinātu ($p<0.05$) neitrālo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu resnās zarnas kriptās, taču probiotiku izēdināšana būtiski palielināja skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu resnās zarnas kriptās P grupas sivēniem, salīdzinot ar C grupas sivēniem (3.19. tabula).

Barības komponentu ietekme uz skābo un neitrālo mukopolisaharīdu producējošo kausveida šūnu skaitu un blīvumu tievās (*jejunum*) un resnās (*colon*) zarnas bārkstīņās un kriptās, $\bar{x} \pm SE$

Parametrs/lokālizācija	Grupa				P vērtība
	C	P	PB	H	
zarnu bārkstiņas (<i>jejunum</i>)					
PAS ⁺ n/bārkstiņā	8.30±0.645	9.63±0.685	9.48±0.510	10.00±0.621	0.4221
PAS ⁺ /bārkstiņas augstuma vienībās (μm)*	0.03±0.003	0.02±0.001	0.02±0.001	0.02±0.001	0.2158
AB ⁺ n/bārkstiņā	8.05±0.720 ^b	10.78±0.686 ^a	9.45±0.556 ^{ab}	8.37±0.512 ^b	0.0116
AB ⁺ /bārkstiņas augstuma vienībās (μm)*	0.02±0.003 ^a	0.03±0.002 ^a	0.02±0.001 ^a	0.02±0.002 ^b	0.0004
zarnu kriptas (<i>jejunum</i>)					
PAS ⁺ n/kriptā	20.30±1.244	21.98±0.708	21.83±0.697	21.53±0.617	0.5588
PAS ⁺ /kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.07±0.006	0.07±0.003	0.08±0.004	0.08±0.003	0.3131
AB ⁺ n/kriptā	21.10±0.932 ^{ab}	22.53±1.005 ^a	20.38±0.690 ^{ab}	19.13±0.687 ^b	0.0240
AB ⁺ /kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.07±0.005	0.08±0.004	0.07±0.003	0.07±0.003	0.2604
zarnu kriptas (<i>colon</i>)					
PAS ⁺ n/ kriptā	29.35±1.091 ^b	35.60±1.182 ^a	36.15±1.057 ^a	34.30±1.450 ^a	0.0082
PAS ⁺ /kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.06±0.003	0.07±0.002	0.07±0.002	0.07±0.005	0.4529
AB ⁺ n/ kriptā	31.20±1.423 ^y	35.78±0.655 ^x	34.80±1.181 ^{xy}	33.48±1.312 ^{xy}	0.0841
AB ⁺ / kriptas dziļuma vienībās (μm)*	0.07±0.004	0.07±0.002	0.07±0.003	0.07±0.003	0.9939

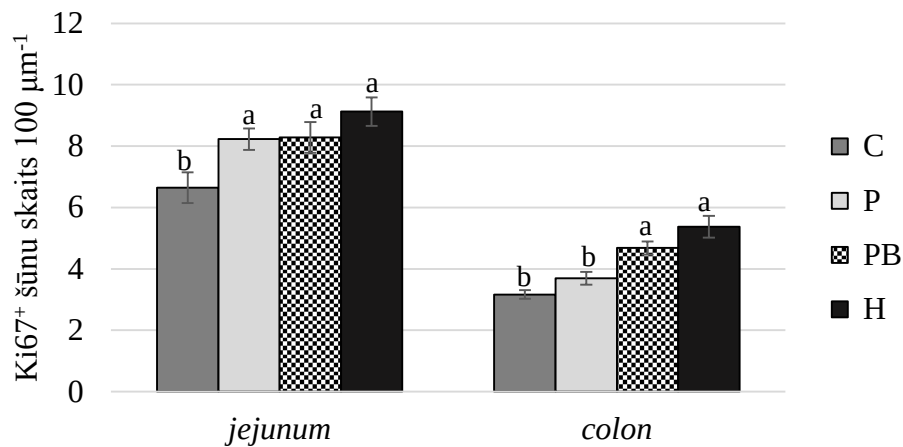
PAS⁺ – neitrālo mukopolisaharīdu producējošās kausveida šūnas, AB⁺ – skābo mukopolisaharīdu producējošās kausveida šūnas, n – skaits, *neitrālo (PAS⁺) vai skābo (AB⁺) mukopolisaharīdu kausveida šūnu skaits attiecībā uz bārkstīņu augstumu vai kriptu dziļumu ^{a, b} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras (p<0.05), ^{x, y} – vidējām vērtībām vienā rindā ar dažādiem burtiem ir tendence atšķirties (0.05<p≤0.10), SE – standartkļūda.

3.2.4. Epitēlija šūnu proliferācijas (Ki67) un T limfocītu (CD3 pozitīvo šūnu) infiltrācijas imūnhistoķīmiskā analīze

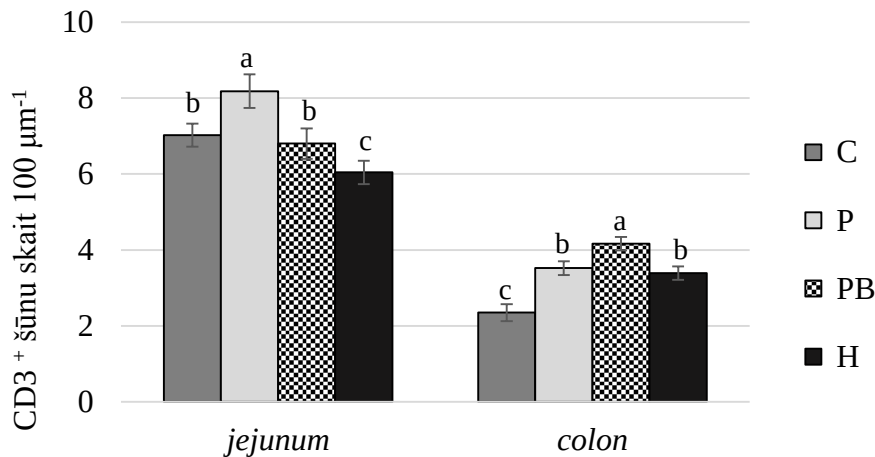
Ki67 pozitīvās šūnas dominēja tievās zarnas kriptu daļā un Peijera plātņu dīgļu (*germinal*) centros, bet resnajā zarnā tās dominēja kriptu dziļākajās daļās. Iekaisuma šūnu izraisīta viegla līdz mēreni stipra Ki67 pozitīvo šūnu reakcija tika novērota sivēnu tievās un resnās zarnas gļotādas *lamina propria* daļā. Salīdzinot ar C grupas sivēniem, P, PB un H grupām novērojām lielāku (p<0.05) Ki67 pozitīvo epitēlija šūnu blīvumu tievās zarnas kriptās, bet PB un H grupu sivēniem – resnās zarnas kriptās (3.8. attēls).

Sivēniem tievajā zarnā intraepitēliālā CD3 pozitīvo šūnu blīvums bija lielāks (p<0.05) P grupā, taču H grupā tas būtiski samazinājās (p<0.05), resnajā zarnā lielāks intraepitēliālā CD3 pozitīvo šūnu blīvums tika novērots visās pētījuma grupās, kur barības pamatdevai tika pievienotas papildus barības komponenti, taču vislielāko efektu novēroja PB grupai (3.9. attēls).

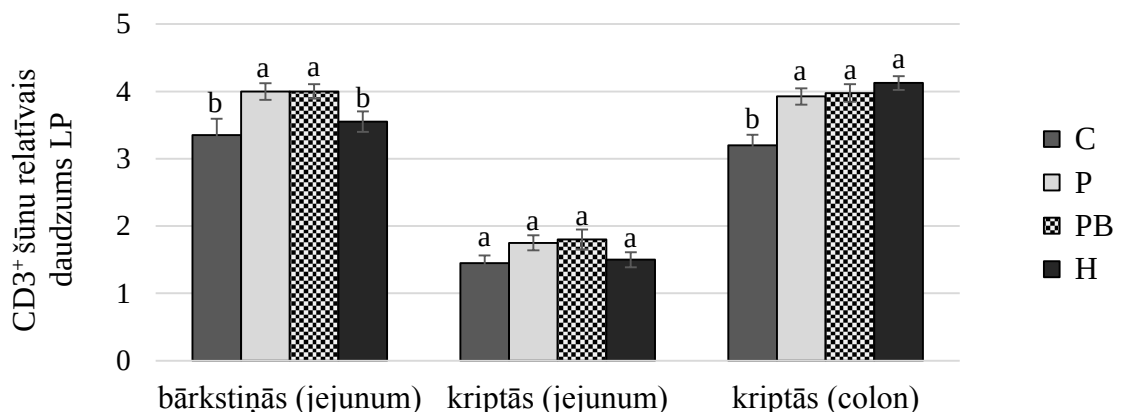
Novērtējot CD3 pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu zarnu gļotādas *lamina propria* daļā, konstatējām nelielu CD3 pozitīvo šūnu daudzumu tievās zarnas kriptu daļā līdz maz-vidēji daudz CD3 pozitīvo šūnu daudzumu tievās zarnas bārkstīņu un resnās zarnas kriptu daļā. Tievās zarnas bārkstīņu daļā P un PB grupas sivēniem bija novērojams augstāks (p<0.05) CD3 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums, salīdzinot ar C un H grupas sivēniem, taču resnās zarnas kriptu daļā – būtiski augstāks CD3 pozitīvo šūnu daudzums tika konstatēts P, PB un H grupās (3.10. attēls).



3.8. att. Barības komponentu ietekme uz Ki67 pozitīvo epitēlija šūnu blīvumu ($\bar{x} \pm SE$) sivēnu tievās (*jejenum*) un resnās (*colon*) zarnas kriptās
(a, b) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, $p < 0.05$.



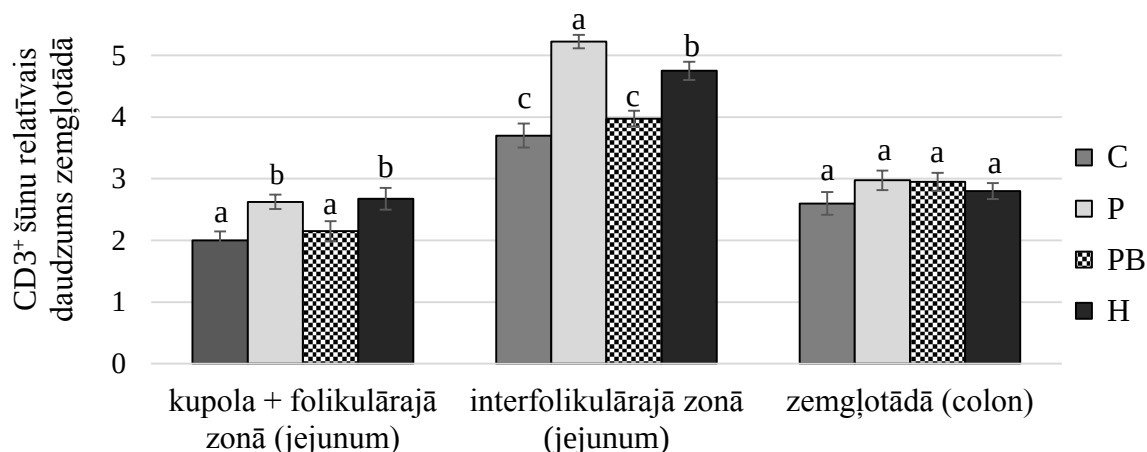
3.9. att. Barības komponentu ietekme uz intraepitēliālo CD3 pozitīvo (CD3⁺) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) sivēnu tievajā (*jejenum*) un resnajā (*colon*) zarnā
(a, b, c) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, $p < 0.05$.



3.10. att. Barības komponentu ietekme uz CD3 pozitīvo (CD3⁺) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) tievās (*jejenum*) un resnās (*colon*) zarnas gļotādas *lamina propria* (LP) daļā
(a, b) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, $p < 0.05$.

Novērtējot CD3 pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu zarnu limfoido audu sakopojumos un resnās zarnas submukozas daļā, konstatējam, ka vidēji līdz daudz CD3 pozitīvo šūnu lokalizējas

Peijera plašu interfolikulārajā zonā, mazs līdz vidēji daudz CD3 pozitīvo šūnu novērojām Peijera plašu kupola daļā, taču salīdzinoši reti – Peijera plašu dīgļu (*germinal*) centros. Resnās zarnas submukozas daļā novērojām vidēji daudz CD3 pozitīvo šūnu. Probiotikas un augu piedeva palielināja ($p<0.05$) CD3 pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu Peijera plašu interfolikulārajā un folikulārajā+kupola zonā (3.11. attēls), taču nenovērojām statistiski nozīmīgas atšķirības starp pētījuma grupām, vērtējot pēc CD3 pozitīvo šūnu sadalījuma resnās zarnas submukoza.



3.11. att. Barības komponentu ietekme uz CD3 pozitīvo (CD3⁺) šūnu relatīvo daudzumu ($\bar{x} \pm SE$) tievās zarnas (jejunum) Peijera platēs un resnās zarnas (colon) zemgļotādas daļā (a, b, c) atšķirīgi burti nozīmē būtiskas atšķirības starp pētījuma grupām, $p<0.05$.

3.2.5. Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu *m. Longissimus thoracis et lumborum* muskuļaudos 56. dienu veciem sivēniem

Sivēniem, kuru pamatbarībai pievienojām probiotikas, novērojām augstāku ($p<0.05$) α -linolēnskābes un palmitoleīnskābes, bet zemāku ($p<0.05$) stearīnskābes procentuālo īpatsvaru salīdzinot ar kontroles grupas sivēniem. Savukārt H un PB grupas sivēnu muskuļaudi saturēja tikai augstāku α -linolēnskābes procentuālo īpatsvaru, salīdzinot ar C grupu. Būtiski zemāks ($p<0.05$) piesātināto taukskābju saturs un augstāka ($p>0.05$) polinepiesātināto un piesātināto taukskābju SFA attiecība tika novērota P grupai, salīdzinot ar C grupu (3.20. tabula).

3.20. tabula

Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu* ($\bar{x} \pm SE$) *m. Longissimus thoracis et lumborum* muskuļaudos 56 dienu veciem sivēniem

Taukskābes	Grupa			
	C	P	PB	H
C18:3 ω 3 α -linolēnskābe, %	0.9 $\pm$ 0.12 ^b	1.8 $\pm$ 0.10 ^a	1.6 $\pm$ 0.10 ^a	1.5 $\pm$ 0.10 ^a
C20:4 ω 6 arahidonskābe, %	1.40 $\pm$ 0.2 ^a	0.75 $\pm$ 0.05 ^{a,b}	1.05 $\pm$ 0.15 ^{a,b}	0.50 $\pm$ 0.10 ^b
C18:2 ω 6 linolskābe, %	10.37 $\pm$ 0.70	11.60 $\pm$ 0.40	11.85 $\pm$ 0.75	9.65 $\pm$ 0.75
C18:1 ω 9 oleīnskābe, %	41.63 $\pm$ 0.49 ^{a,b}	42.55 $\pm$ 0.95 ^a	39.60 $\pm$ 0.60 ^b	42.55 $\pm$ 0.25 ^a
C16:1 ω 7 palmitoleīnskābe, %	3.07 $\pm$ 0.26 ^b	4.55 $\pm$ 0.25 ^a	4.25 $\pm$ 0.55 ^{a,b}	3.25 $\pm$ 0.15 ^b
C16:0 palmitīnskābe, %	24.50 $\pm$ 0.61	24.25 $\pm$ 0.15	25.75 $\pm$ 0.05	24.65 $\pm$ 0.45
C18:0 stearīnskābe, %	13.13 $\pm$ 0.13 ^a	9.40 $\pm$ 0.60 ^b	11.20 $\pm$ 1.30 ^{a,b}	13.10 $\pm$ 0.70 ^a

Taukskābes	Grupa			
	C	P	PB	H
SFA, %	40.22±0.49 ^a	36.70±0.25 ^b	40.08±1.23 ^a	40.53±1.13 ^a
MUFA, %	47.15±0.63 ^{a,b}	49.03±1.08 ^a	45.65±0.75 ^b	48.05±0.20 ^{a,b}
PUFA, %	13.40±0.85	14.90±0.60	15.10±0.80	12.25±0.95
PUFA:SFA	0.33±0.02	0.41±0.01	0.38±0.03	0.30±0.03

* tabulā nav atainotas visas konstatētās taukskābes; SFA – piesātinātās taukskābes; MUFA – mononepiesātinātās taukskābes; PUFA – polinepiesātinātās taukskābes; PUFA:SFA – polinepiesātināto piesātināto taukskābju attiecība; ^{a, b} – vidējās vērtības vienā rindā ar dažādiem burtiem būtiski atšķiras ($p < 0.05$).

3.3. Ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums, antibakteriālā darbība un dažādu piedevu ietekme uz ēterisko eļļu efektivitāti pret ESBL producējošiem *E. coli*

3.3.1. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums

Salīdzinot laboratorijas apstākļos iegūto un komerciāli pieejamo ēterisko eļļu ķīmisko sastāvu, novērojām salīdzinoši vērā ņemamus gan gaistošo savienojumu sastāva, gan koncentrācijas atšķirības starp mūsu laboratorijas apstākļos iegūtajām (Latvijas) un Eiropas dienvidu un Vidusjūras reģionā iegūto Lūpziežu dzimtas augiem. Visvairāk ($n=69$) gaistošie savienojumi tika identificēti Latvijas izcelsmes *T. serpyllum* (mazais mārsils) ēteriskajā eļļā, kamēr komerciālajā *T. vulgaris* (parastais timiāns) – attiecīgi tikai 38 gaistošos savienojumus (skat. 2. pielikumu). Komerciālās ēteriskās eļļas raksturojās ar augstāku aromātisko monoterpenoīdu procentuālo koncentrāciju, piemēram, timols un karvakrols veidoja 30-56% no kopējā sastāva. Savukārt, ēteriskajās eļļās, kas iegūtas laboratorijas apstākļos, saturēja ievērojami zemāku timola un karvakrola daudzumu, t.i. 12-37%. Taču tai pašā laikā jāuzsver, ka nenovērojām būtiskas atšķirības starp Latvijas un komerciālās izcelsmes *T. vulgaris* ēteriskajām eļļām attiecībā uz kopējo monoterpenoīdu procentuālo daudzumu, kas attiecīgi bija 31% un 30%. Visaugstāko monoterpenoīdu ogļūdeņražu līmeni novērojām mūsu laboratorijas apstākļos iegūtās *T. serpyllum* (2446 mg kg⁻¹) un *S. montana* (kalnu pupumētra) (2303 mg kg⁻¹) ēteriskajās eļļās. Turklāt visu trīs laboratorijas apstākļos iegūto ēterisko eļļu sastāvā būtiski augstāku novērojām γ -terpinēna procentuālo koncentrāciju (17.83-22.42%), kamēr komerciālajās ēteriskajās eļļās tā daudzums, atkarībā no ēteriskās eļļas veida, svārstījās no 5.81-9.24% (3.21. tabula).

Galvenie komerciālās *T. vulgaris* ēteriskās eļļas komponenti bija *p*-cimēns (35,4%), timols (26.66%), β -linalols (7.31%) un γ -terpinēns (5.81%), bet laboratorijas apstākļos iegūtās *T. vulgaris* ēteriskās eļļas galvenie komponenti bija timols (27.59%), *p*-cimēns (23.63%) un γ -terpinēns (17.83%). Komerciālajā *S. montana* ēteriskajā eļļā galvenie komponenti bija karvakrols (26.37%), timols (17.10%), β -kariofilēns (14.37%), *p*-cimēns (13.02%) un γ -terpinēns (6.64%), taču laboratorijas apstākļos iegūtās *S. montana* ēteriskās eļļas galvenie komponenti bija karvakrols (35.54%), γ -terpinēns (22.42%), *p*-cimēns (10.54%). Būtiskas atšķirības konstatējām starp komerciālo un laboratorijas apstākļos iegūtās *T. serpyllum* ēteriskās eļļas galvenajiem komponentiem un to koncentrācijām. Komerciālajā ēteriskajā eļļā tie bija karvakrols (53.34%), γ -terpinēns (9.24%), *p*-cimēns (8.18%), bet laboratorijas apstākļos iegūtās ēteriskās eļļas galvenie komponenti bija γ -terpinēns (21.93%), β -kariofilēns (12.49%), *p*-cimēns (8.94%), *trans*-geraniols (8.37%) un karvakrols (7.70%) (3.21. tabula).

Komerčiālo un laboratorijas apstākļos iegūtu ēterisko eļļu galvenie ķīmiskie savienojumi* un identificēto molekulāro klašu kopējais daudzums, $\bar{x} \pm SD$

RI	Komponentu nosaukumi	Saturis, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Satureja montana</i>		<i>Thymus serpyllum</i>	
		C	LV	C	LV	C	LV
1165	β -mircēns+ α -felandrēns ¹	38.8±3.4 (1.51)	54.3±2.4 (0.20)	58.0±1.3 (1.14)	172.8±15.2 (3.36)	188.0±17.7 (4.30)	201.7±15.6 (3.43)
1200	limonēns ¹	91.1±10.1 (3.55)	13.9±0.6 (0.57)	16.4±0.3 (0.32)	44.1±3.0 (0.86)	18.8±0.9 (0.43)	25.3±0.7 (0.43)
1249	γ -terpinēns ¹	149.0±15.2 (5.81)	437.8±16.3 (17.83)	336.7±8.3 (6.64)	1152.1±50.7 (22.42)	404.4±28.7 (9.24)	1291.0±18.4 (21.93)
1275	<i>p</i> -cimēns ¹	908.5±35.9 (35.4)	580.2±22.6 (23.63)	660.1±21.9 (13.02)	543.6±42.6 (10.58)	358.0±30.1 (8.18)	526.6±29.7 (8.94)
1548	β -linalols ²	187.5±13.9 (7.31)	88.0±7.0 (3.58)	35.2±1.0 (0.69)	103.5±10.5 (2.01)	138.7±10.0 (3.17)	11.2±0.8 (0.19)
1614	β -cariofilēns ⁴	42.3±3.6 (1.65)	79.3±4.9 (3.23)	728.6±25.6 (14.37)	173.4±17.4 (3.37)	149.7±10.3 (3.42)	735.4±26.9 (12.49)
1851	<i>trans</i> -geraniols ²	—	5.2±0.2 (0.21)	6.2±0.2 (0.12)	—	—	492.5±15.9 (8.37)
2143	timols ³	684.2±36.9 (26.66)	677.6±36.3 (27.59)	867.3±18.1 (17.10)	72.6±5.9 (1.41)	43.9±2.7 (1.00)	220.3±13.7 (3.74)
2183	karvakrols ³	78.9±6.2 (3.07)	34.7±2.2 (1.41)	1337.3±8.4 (26.37)	1826.0±69.1(35.54)	2334.4±46.1(53.34)	453.1±22.3 (7.70)
Kopā identificēti:		2536.9 (99.70)	2388.7 (99.14)	5041.9 (99.91)	5090.2 (99.59)	4270 (99.6)	5849.1 (99.77)
monoterpēna ogļūdeņraži		1391.0±74.4	1229.6±49.3	1280.5±35.1	2302.3±144	1335.2±105.9	2446.4±90.2
skābekli saturoši monoterpēni		312.4±22.9	216.7±14.2	339.7±6.2	308.8±28.5	302.5±20.2	1008.4±56.5
aromātiskie monoterpenoīdi		766.4±43.1	749.7±40.2	2233.8±27	1906.1±75	2382.8±48.8	742.6±39.3
seskviterpēna ogļūdeņraži		50.1±4.0	93.7±5.7	1029.8±37.1	308.8±28.5	209.6±14.8	1188.5±72.9
skābekli saturošie seskviterpēni		12.4±0.9	20.1±0.9	51.3±0.9	23.7±1.2	21.4±0.8	263.8±19.7
alifātiskie aldehīdi un ketoni		—	4.9±0.1	4.4±0.1	4.5±0.1	—	30.7±0.7
alifātiskie spirti		—	46.7±3.1	75.9±1.4	191.8±24.1	14.7±0.4	57.3±2.1
esteri		4.6±0.2	27.5±0.9	26.6±0.8	53.6±4.8	3.8±0.9	111.5±8.6
Timols**		836.1±44.4	828.0±44.0	1056.1±21.8	100.0±7.1	65.36±3.3	278.41±16.5

* – Tabulā nav atainoti visi identificētie ķīmiskie komponenti. ** – aprēķināts pēc timola ārējās kalibrācijas. RI – aprēķinātais aiztures indekss (temperatūras programmētā hromatogrāfija) pret C9-C26n-alkāniem attiecībā uz OMEgawax 250 kapilārās kolonnas. Gaistošo savienojumu koncentrācija tika izteikta, izmantojot iegūto kampara ārējā standarta kalibrēšanas līkni. % – dati iekavās ir iegūto gaistošo vielu procentuālā daļa no kopējās gaistošo savienojumu koncentrācijas. C – komerciālās ēteriskās eļļas, LV – laboratorijas apstākļos iegūtās ēteriskās eļļas no Latvijā ievāktiem augiem. Augšrakstā ¹⁻⁴ – savienojumu molekulārās klases: 1 – monoterpēna ogļūdeņraži, 2 – skābekli saturoši monoterpēni, 3 – aromātiskie monoterpēni, 4 – seskviterpēna ogļūdeņraži.

3.3.2. Komerčiālo un Latvijas ēterisko eļļu antibakteriālā aktivitāte pret *E. coli*

Saskaņā ar iegūtajiem antibakteriālās darbības rezultātiem, nenovērojām būtiskas atšķirības starp minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) un minimālo baktericīdo koncentrāciju (MBC) pie nomākuma līmeņa 95% un 99.5% gan pret references *E. coli* celmu, gan arī pret *E. coli*, izolētiem no cūku fekālijām (3.22. tabula).

3.22. tabula

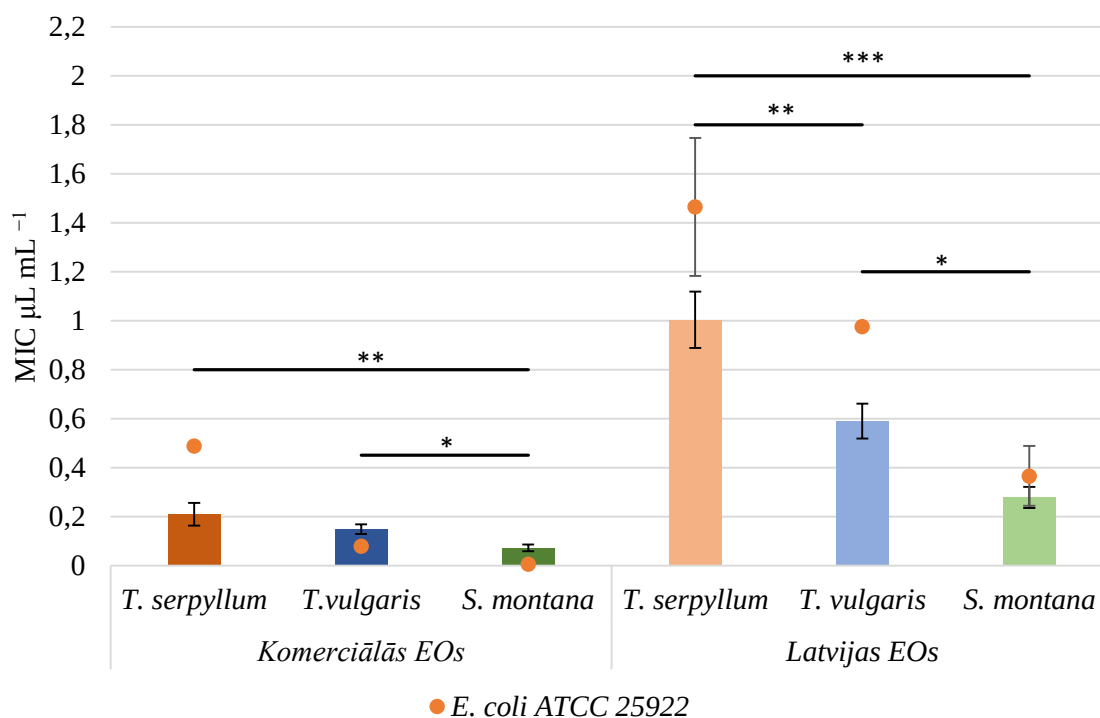
Komerčiālo un Latvijas ēterisko eļļu minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā baktericīdā koncentrācija (MBC pie 95% un 99.5%) pret references *E. coli* un *E. coli*, izolētiem no cūku fekālijām, $\bar{x} \pm SE$

Ēteriskās eļļas		MIC $\mu\text{L mL}^{-1}$		MBC 95% $\mu\text{L mL}^{-1}$		MBC 99.5% $\mu\text{L mL}^{-1}$	
		komen. <i>E. coli</i>	ATCC 25922	komen. <i>E. coli</i>	ATCC 25922	komen. <i>E. coli</i>	ATCC 25922
Komerčiālās	<i>T. serpyllum</i>	0.209± 0.0464	0.488± 0.0000	0.209± 0.0464	0.488± 0.0000	0.209± 0.0464	0.488± 0.0000
	<i>T. vulgaris</i>	0.148± 0.0200	0.079± 0.0202	0.148± 0.0200	0.079± 0.0202	0.148± 0.0200	0.079± 0.0202
	<i>S. montana</i>	0.073± 0.0137	0.006± 0.0031	0.076± 0.0144	0.006± 0.0031	0.076± 0.0144	0.006± 0.0031
Latvijas	<i>T. serpyllum</i>	1.004± 0.1149	1.465± 0.2819	1.221± 0.1134	1.465± 0.2819	1.221± 0.1134	1.465± 0.2819
	<i>T. vulgaris</i>	0.590± 0.0713	0.977± 0.0000	0.644± 0.0763	0.977± 0.0000	0.658± 0.0733	0.977± 0.0000
	<i>S. montana</i>	0.278± 0.0434	0.366± 0.1221	0.278± 0.0434	0.367± 0.1221	0.278± 0.0434	0.366± 0.1221

MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija, MBC – minimālā baktericīdā koncentrācija, komen. – komensālais.

Analizējot ēteriskās eļļas antibakteriālās darbības ietekmējošos faktorus, konstatējām, ka tādi faktori kā ēterisko eļļu izcelsme (komerciālās un Latvijā laboratorijas apstākļos iegūtas) un augu suga (*T. vulgaris*, *T. serpyllum* un *S. montana*) būtiski ietekmē ēteriskās eļļas antibakteriālo darbību pret *E. coli*. Laboratorijas apstākļos iegūtajām ēteriskajām eļļām bija augstākas ($p < 0.001$) MIC vērtības, salīdzinot ar komerciālajām ēteriskajām eļļām, turklāt novērojām būtiskas ($p < 0.001$) atšķirības starp ēterisko eļļu augu sugām. No laboratorijas apstākļos iegūtajām ēteriskajām eļļām visefektīvākā bija *S. montana*, bet viszemākā antibakteriālā darbība tika novērota *T. serpyllum* ēteriskajai eļļai. Tāpat novērojām būtiskas ($p = 0.002$) atšķirības antibakteriālā darbībā starp dažādu augu sugu komerciālajām ēteriskajām eļļām. Visefektīvākā bija *S. montana* ēteriskā eļļa, taču nenovērojām būtiskas atšķirības ēterisko eļļu antibakteriālā efektivitātē, kas iegūtas no *T. vulgaris* un *T. serpyllum* (3.12. attēls).

Salīdzinot viena un tā paša auga sugas ēteriskās eļļas, bet ar atšķirīgu izcelsmi, tad zemākās MIC vērtības atšķirības novērotas ēteriskām eļļām, kas iegūtas no *S. montana*, taču, neskatoties uz to, Latvijā audzētiem *S. montanas* un dienvideiropas izcelsmes *S. montana* MIC vērtības savstarpēji atšķīrās būtiski ($p = 0.013$). Interesanti, ka laboratorijas apstākļos iegūtām ēteriskām eļļām novēroja augstākas MIC vērtības pret antibiotiku jutīgu *E. coli* references celmu ATCC 25922 nekā pret *E. coli*, kas izolēts no cūku fekālijām; savukārt komerciālajām eļļām šāda tendence tika novērota tikai *T. serpyllum* ēteriskajai eļļai (3.12. attēls).



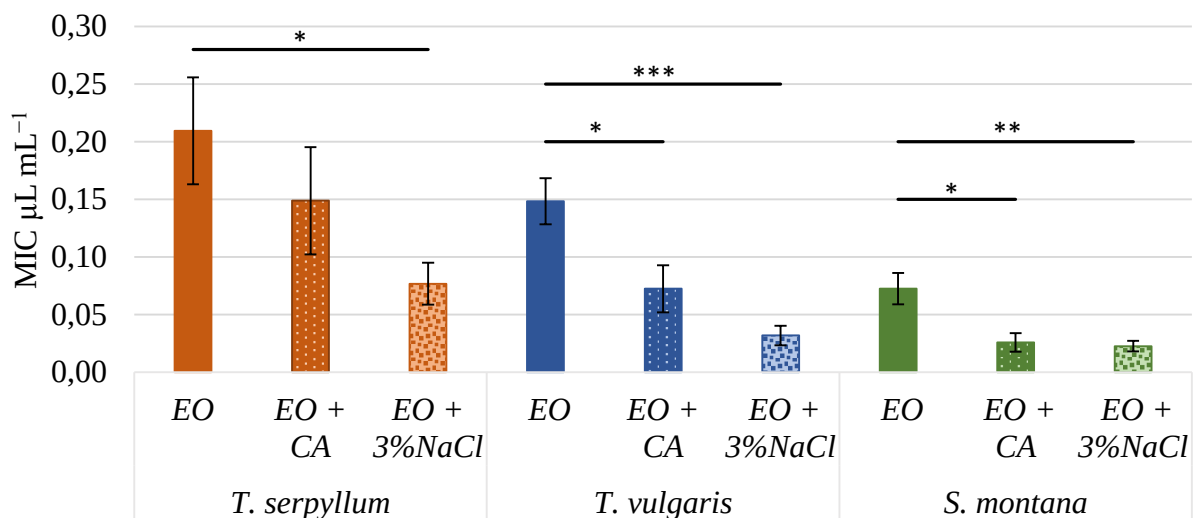
3.12. att. Komerčiālo un Latvijas ēterisko eļļu (EO) MIC vērtību ($\bar{x} \pm SE$) salīdzinājums pret references *E. coli* ATCC 25922 un *E. coli*, izolētiem no cūku fekālijām

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.3.3. Kaprīlskābes un sāls piedevu ietekme uz ēterisko eļļu antibakteriālo darbību pret *E. coli*

Balstoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, vienas pašas piedevas – gan 3% NaCl, gan arī 1mM kaprīlskābe neizraisīja *E. coli* augšanas nomākumu vai baktericīdo efektu ne pret vienu no 10 pētījumā iekļautajiem *E. coli*, taču tai pašā laikā, komerciālo eļļu papildināšana ar 3% NaCl ($p < 0.001$) vai 1 mM kaprīlskābi ($p = 0.012$) būtiski palielināja to antibakteriālo darbību pret *E. coli*. Salīdzinot savstarpēji piedevu (NaCl un kaprīlskābes) ietekmi uz ēteriskās eļļas antibakteriālās aktivitātes palielināšanu, nenovērojām būtiskas atšķirības, taču statistiski novērojām tendenci ($p = 0.078$), ka NaCl kā piedeva ēteriskajai eļļai ir efektīvāka, lai palielinātu antibakteriālo darbību.

Papildinot *T. serpyllum* ēterisko eļļu ar kaprīlskābi, MIC vērtība samazinājās par 29% (no 0.209 ± 0.046 līdz $0.149 \pm 0.047 \mu\text{L mL}^{-1}$, $p = 0.810$), savukārt, papildinot šo pašu ēterisko eļļu ar 3% NaCl, MIC vērtība samazinājās ($p = 0.018$) par 63% (no 0.209 ± 0.046 līdz $0.077 \pm 0.018 \mu\text{L mL}^{-1}$). Papildinot *T. vulgaris* ēterisko eļļu ar kaprīlskābes piedevu, MIC vērtība samazinājās par 51% (no 0.148 ± 0.020 līdz $0.072 \pm 0.020 \mu\text{L mL}^{-1}$, $p = 0.011$), bet papildinot ar 3% NaCl piedevu, attiecīgi par 78% (no 0.148 ± 0.020 līdz $0.032 \pm 0.009 \mu\text{L mL}^{-1}$, $p < 0.001$). Savukārt *S. montana* ēterisko eļļu papildinot ar kaprīlskābi vai 3% NaCl piedevu, novēroja attiecīgi MIC vērtības samazināšanos par 64% (no 0.073 ± 0.014 līdz $0.023 \pm 0.008 \mu\text{L mL}^{-1}$, $p = 0.017$) un 69% (no 0.073 ± 0.014 līdz $0.023 \pm 0.005 \mu\text{L mL}^{-1}$, $p = 0.001$) (3.13. attēls).



3.13. att. Kaprilskābes (CA) un NaCl piedevu ietekme uz komerciālo ēterisko eļļu (EO) antibakteriālo darbību (MIC, $\bar{x} \pm SE$) pret *E. coli*
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.3.4. Ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu antibakteriālās aktivitātes salīdzinājums pret ESBL producējošiem/ne-producējošiem *E. coli* un multirezistentajiem/ne-multirezistentajiem *E. coli*

Mēs novērojam, ka ēterisko eļļu papildināšana ar 3% NaCl būtiski ($p < 0.001$) samazināja MIC vērtības pret ESBL-producējošiem *E. coli*, savukārt, tikai nelielu tendenci ($p = 0.100$) samazināt MIC vērtību pret ESBL producējošo *E. coli* novērojam, papildinot ēterisko eļļu ar kaprilskābes piedevu. Turklāt ēteriskās eļļas, kas iegūtas no *T. vulgaris* un *S. montana*, bija būtiski efektīvākas pret ESBL producējošajiem *E. coli*, salīdzinot ar *T. serpyllum* ēterisko eļļu.

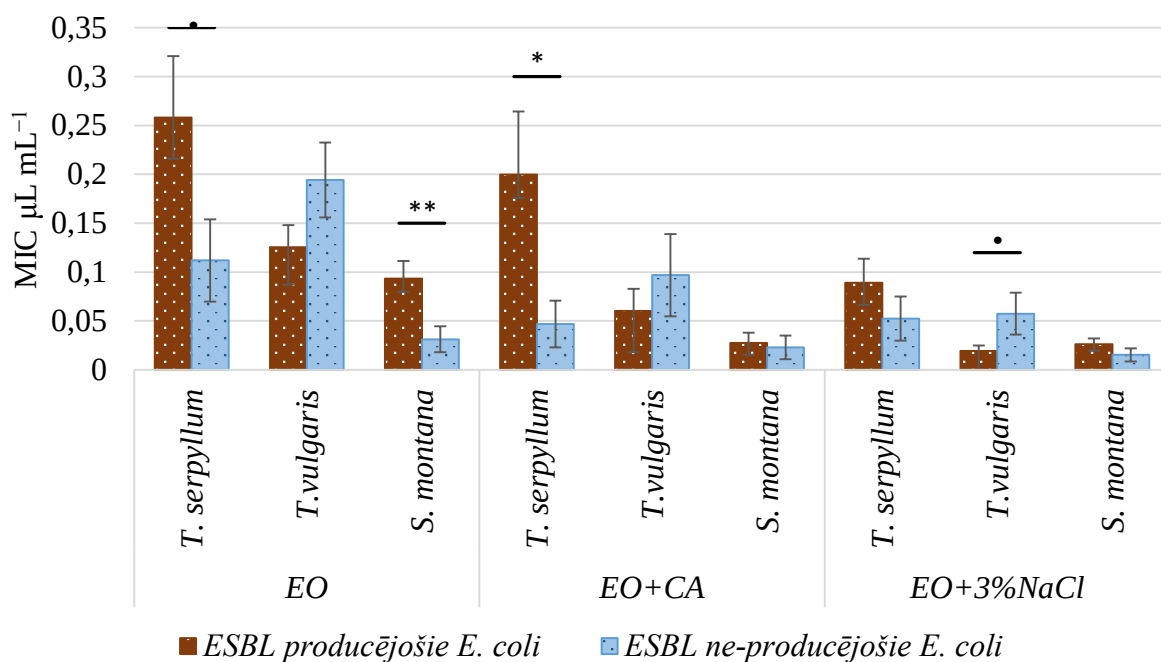
Salīdzinot katras ēteriskās eļļas efektivitāti pret ESBL producējošiem un neproducējošiem *E. coli*, tika konstatēts, ka *S. montana* ēteriskajai eļļai ir būtiski zemākas MIC vērtības pret ESBL neproducējošiem *E. coli*, salīdzinot pret ESBL producējošiem *E. coli*, līdzīga tendence tika novērota arī *T. serpyllum* ēteriskajai eļļai. Savukārt *T. vulgaris* ēteriskajai eļļai novērojam zemākas MIC vērtības pret ESBL producējošiem *E. coli*, taču tas netika vērtēts kā statistiski būtiski.

Salīdzinot katras papildinātās ēteriskās eļļas efektivitāti pret ESBL producējošiem un neproducējošiem *E. coli*, konstatējām, ka *T. vulgaris* ēteriskajai eļļai, kas papildināta ar 3% NaCl piedevu, bija tendence būt zemākām MIC vērtībām pret ESBL producējošiem *E. coli*. Tomēr vairumā gadījumu ēteriskās eļļas, papildinot ar NaCl un kaprilskābes piedevām, bija vienlīdz efektīvas gan pret ESBL producējošiem, gan ESBL neproducējošiem *E. coli* (3.14. attēls).

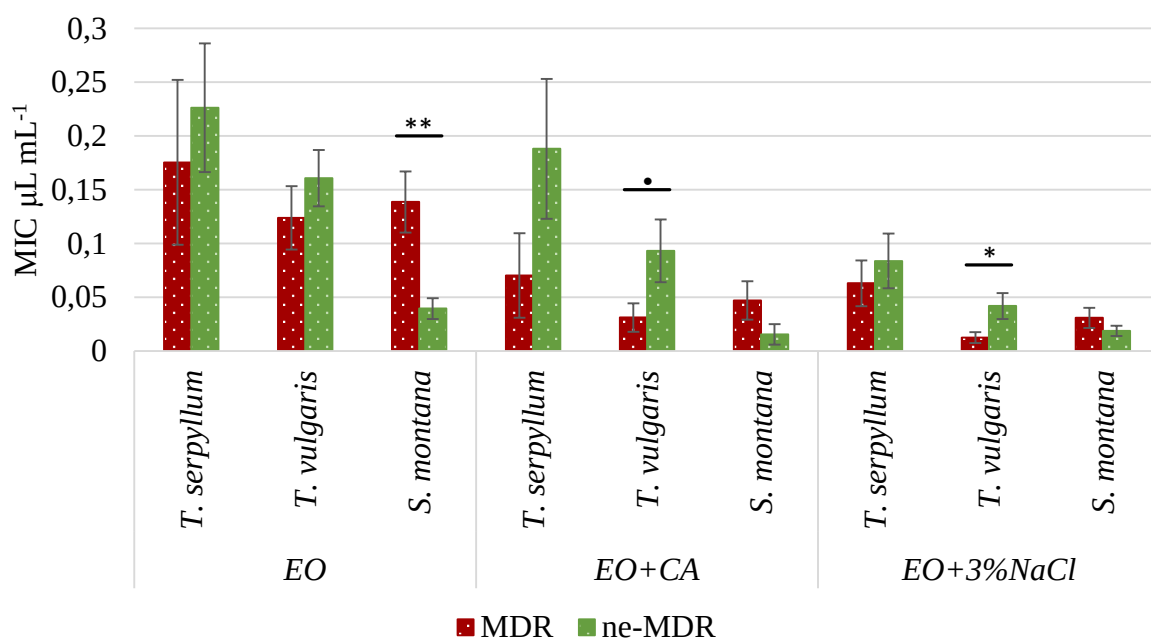
Salīdzinot tīru ēterisko eļļu un papildināto (ar kaprilskābi vai 3% NaCl) ēterisko eļļu efektivitāti pret multirezistentajiem (MDR) *E. coli*, konstatējām, ka papildinātās ēteriskās eļļas bija ar būtiski ($p < 0.001$) lielāku aktivitāti pret MDR *E. coli*, kā rezultātā novērojam zemākas MIC vērtības. Mēs nenovērojam, ka faktoram "auga suga" būtu būtiska ietekme uz antibakteriālo aktivitāti pret MDR *E. coli* gan grupā, kur salīdzinājam tīru ēterisko eļļu efektivitāti, gan grupā, kur ēteriskās eļļas bija papildinātas ar kaprilskābi, taču "ēterisko eļļu un NaCl piedevas" grupā konstatējām, ka *T. vulgaris* ēteriskā eļļa bija efektīvāka ($p = 0.013$) kā *T. serpyllum*.

Salīdzinot katras ēteriskās eļļas (ar un bez piedevām) antibakteriālās darbības efektivitāti pret MDR/ne-MDR *E. coli*, tīra *S. montana* ēteriskā eļļa bija būtiski efektīvāka pret ne-MDR *E. coli*, taču *T. vulgaris* ēteriskā eļļa, kas papildināta ar kaprilskābes piedevu, bija efektīvāka ($p = 0.061$) pret MDR *E. coli* nekā ne-MDR *E. coli*, MIC vērtības attiecīgi bija 0.03 ± 0.013 un

$0.09 \pm 0.029 \mu\text{L mL}^{-1}$, tāpat *T. vulgaris* ēteriskā eļļa, kas papildināta ar 3% NaCl, bija efektīvāka pret MDR *E. coli* nekā ne-MDR *E. coli*, MIC vērtības attiecīgi bija 0.01 ± 0.005 un $0.04 \pm 0.012 \mu\text{L mL}^{-1}$ ($p=0.032$) (3.15. attēls).



3.14. att. Ēterisko un bagātināto ēterisko eļļu (ēteriskā eļļa +3% NaCl (EO+3%NaCl)) un ēteriskā eļļa+kaprīlskābe (EO+CA)) antibakteriālās aktivitātes (MIC, $\bar{x} \pm \text{SE}$) salīdzinājums pret ESBL producējošiem un ESBL ne-producējošiem *E. coli*
 • $p=0.05-0.10$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.



3.15. att. Ēterisko eļļu (EO) un bagātināto ēterisko eļļu (ēteriskā eļļa +3% NaCl (EO+3%NaCl)) un ēteriskā eļļa+kaprīlskābe (EO+CA)) antibakteriālās aktivitātes (MIC, $\bar{x} \pm \text{SE}$) salīdzinājums pret multirezistentajiem (MDR) un ne-multirezistentajiem *E. coli* (ne-MDR)
 • $p=0.05-0.10$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

4. DISKUSIJA

4.1. Pret antibiotikām rezistentā *E. coli* un ESBL producējošā *E. coli* izplatība cūkām Latvijā

4.1.1. Biežāk lietotie antimikrobiālie līdzekļi cūkkopības saimniecībās, to ietekme uz rezistentā *E. coli* izplatību cūku populācijā

Vispārzināms, ka *Escherichia coli* ir cilvēkiem un dzīvniekiem gremošanas trakta normālā mikrobiota, tādējādi lietderīgi ir izolēt no veselu cūku fekālijām komensiālo indikatorbaktēriju – *Escherichia coli* un noteikt tā fenotipisko rezistenci pret antibiotikām, jo tā sniedz informāciju par baktēriju rezistences līmeni pret antibakteriālajiem līdzekļiem cūku populācijā. Komensiālais *E. coli* var būt rezistentu gēnu rezervuārs, tas var tikt pārnests populācijā starp dzīvniekiem, starp dzīvnieku populācijām, kā arī no dzīvnieka uz cilvēku. Pateicoties horizontālajai rezistentu gēnu pārnesei, rezistentie gēni tiek pārnesti arī uz patogēnām baktēriju sugām (EFSA & ECDC, 2020). Tādējādi, gan no sabiedrības, gan no dzīvnieku veselības aspekta, ir svarīgi veikt un uzraudzīt komensiālo *E. coli* rezistenci pret antibiotikām. Īpašu uzmanību pievēršam atšķirīga vecuma cūkām un saimniecības lielumam kā antimikrobiālās rezistences ietekmējošajiem faktoriem.

Fekāliju paraugu ieguves laikā, anketēšanas veidā, ieguvām informāciju no cūku audzēšanas saimniecību īpašniekiem vai saimniecību apkalpojošā veterinārārsta par biežāk lietotajām antibiotikām cūku ārstēšanā saimniecībā un galvenajiem profilaktiskajiem pasākumiem, īpaši pievēršot uzmanību gastrointestinālajiem traucējumiem. Konstatējām, ka jautājumi par antibiotiku lietošanas paradumiem cūku ārstēšanā tiek atbildēti izvairīgi un nepilnīgi. Līdzīgi tika konstatēts arī kādā apjomīgā pārskata ziņojumā par antibiotiku lietošanas paradumiem cūkām, kur 85% pētījumi veikti Eiropā un Ziemeļamerikā. Tika konstatēts, ka detalizētas informācijas iegūšanai par antibiotiku lietošanu saimniecībās, ir nepieciešamas citas metodes, piemēram, antibiotiku izlietošanas pārskati (Lekagul et al., 2019). Taču, neskatoties uz anketēšanas principa trūkumu, sniegtā informācija atklāja būtiskas lietoto antibakteriālo līdzekļu spektra atšķirības starp saimniecībām. Vairums saimniecībās plaši tika izmantotas tādas antibiotikas kā tetraciklīni, plašas darbības penicilīni (amoksicilīns), sulfadiazīna un trimetoprima kombinētie preparāti, bet salīdzinoši retāk – fluorohinoloni un aminoglikozīdu grupas antibiotikas. Cefalosporīnu lietošanu cūku ārstēšanā aptaujā atzina tikai divas no septiņām pētījumā ietvertajām saimniecībām. Saimniecībās, kurās nebija aktuāla sivēnu diareja, kā vienīgie antibakteriālie līdzekļi tika minēti tiamulīns un tilozīns.

Saskaņā ar SPKC “Vienas veselības” ziņojumu (SPKC, 2019), 2015.-2019. gadā Latvijā produktīvajiem dzīvniekiem pārdotākās antibiotiku grupas bija tetraciklīni (29.4-28.2%), plaša spektra penicilīni (20.1-14.9%), makrolīdi, linkozamīdi (10.6-14.5%), aminoglikozīdi (8.8-15.6%), sulfonamīdi un trimetoprimis (5.9-5.3%), fluorohinoloni (2.9-3.1%) un penicilīna un bēta-laktamāzes inhibitoru kombinācijas (1.5-1.1%). Eiropā, saskaņā ar 10. ESVAC ziņojumu (European Medicines Agency, 2021), kur apkopoti dati par 31 Eiropas valsti, pārdotākās antibiotiku klases bija tetraciklīni (30.7%), penicilīni (28.8%), makrolīdi un linkozamīdi (12.1%), sulfonamīdi un trimetoprimis (10.1%), aminoglikozīdi (6.2%) un fluorohinoloni (2.5%).

Balstoties uz mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem par rezistentu *E. coli* izplatību cūku populācijā, redzam, ka vērojams ļoti augsts un augsts rezistences līmenis pret tetraciklīnu (54.63%), ampicilīnu (32.03%), trimetoprimu (24.07%) sulfametoksazolu-trimetoprimu (22.44%) un amoksicilīnu-klavulānskābi (22.28%). Vidējs rezistences līmenis vērojams pret hloramfenikolu (12.68%), bet zems (<10%) – pret fluorohinoloniem, gentamicīnu, cefazolīnu un trešās paaudzes cefalosporīniem. Ja salīdzinām izolētā *E. coli* rezistenci cūku populācijā un biežāk lietotās antibiotikas cūkkopības saimniecībās, kā arī biežāk pārdotās antimikrobiālās vielas Latvijā un Eiropā, vērojama sakarība, ka visaugstākā izolētā *E. coli* rezistence vērojama

pret antibiotikām, kuras biežāk arī tiek lietotas cūku ārstēšanā, proti, tetraciklīniem, plašas darbības penicilīniem un trimetoprima kombinācijām ar sulfonamīdiem. Līdzīgi kā mūsu pētījuma rezultātos, arī ES ikgadējā antimikrobiālās rezistences ziņojumā (EFSA & ECDC, 2020), un vairums pētnieku pasaulē ir uzsvēruši no cūkām izolētā *E. coli* augsto rezistenci pret tetraciklīnu, ampicilīnu un trimetoprimu, sulfametoksazolu (Burow et al., 2019; Hayer et al., 2020; Ström et al., 2017).

Valsts uzraudzības programmas attiecībā uz antimikrobiālo rezistenci bieži vien ir vērstas uz noteiktu vecuma grupu dzīvniekiem, taču dažādām cūku ražošanas un vecuma grupām (sivēni, sivēnmātes, nobarojamās cūkas) rezistences izplatība būtiski atšķiras (Burow et al., 2019).

Mūsu pētījumā, no četrus nedēļu veciem sivēniem izolētajam *E. coli*, novērojām ļoti augstu rezistenci pret tādām antibiotikām kā tetraciklīnu (66.4%), trimetoprimu un tā kombināciju ar sulfametoksazolu (attiecīgi 37.3% un 40.0%), ampicilīnu (38.2%), hloramfenikolu (25.5%), gentamicīnu (10.9%), fluorohinoloniem (7.2%). Zinātniskajā literatūrā informācijas par perinatālo rezistentu baktēriju un mikrobiotas transmisiju ir salīdzinoši maz (Seale & Millar, 2014). Kādā pētījumā ir pierādīts, ka sākotnēji zīdējsivēnu mikrobiotu lielā mērā ietekmē baktēriju vertikālā pārņemšana no sivēnmātes (maksts, piens), kā arī no vides (grīdas, dzirdnes nipeļa virsmas) mikrobiotas, taču laktācijas laikā aizvien lielāku nozīmi iegūst sivēnmātes fekālā mikrobiota. Laktācijas beigās zīdējsivēni imitē sivēnmātes zarnu ekosistēmu, sagatavojot sivēnus diētas maiņai (Chen et al., 2018). Zinātnieki ir konstatējuši, ka pret tetraciklīnu un ampicilīnu rezistentu *E. coli* klātbūtne sivēnmātes fekālijās nosaka rezistentu *E. coli* klātbūtni sivēnu fekālijās (Burow et al., 2019). Belloc ar līdzautoriem (Belloc et al., 2005) konstatēja no sivēniem izolētajiem *E. coli* rezistenci pret fluorohinoloniem, kuru sivēnmāte pēcatņemšanās periodā ārstēta ar hinolonu grupas antibiotikām, turklāt, rezistentu izolātu klātbūtne sivēnu fekālijās saglabājās vēl divus mēnešus. Sivēnmāšu ārstēšana ar antibiotikām pēcdzemdību periodā būtiski palielina rezistentu *E. coli* izplatību sivēniem ne tikai pret ārstēšanā lietotajām antibiotikām, bet arī pret citiem antimikrobiālajiem līdzekļiem (Callens et al., 2015).

Atšķirtiem sivēniem konstatējām būtisku rezistences samazināšanos pret fluorohinoloniem, gentamicīnu un hloramfenikolu; taču joprojām novērojām augstu rezistenci pret tetraciklīnu, trimetoprimu, bet pret ampicilīnu un amoksicilīnu-klavulānskābi novērojām tendenci rezistences biežumam palielināties. Trijās no septiņām mūsu pētījumā iekļautajām fermām diarejas sastopamība tika raksturota kā bieža, divās – sporādiska; turklāt biežāk pēcatšķiršanas periodā. Kādā pētījumā par antibiotiku lietošanu cūkām no dzimšanas līdz nokaušanai 9 Eiropas valstīs, kur tika iesaistītas 180 fermas, tika konstatēts augstāks ārstēšanas biežums sivēniem pēcatšķiršanas periodā (69.5%), kamēr zīdīšanas periodā – 22.5%. Visbiežāk lietotās aktīvās vielas bija paplašināta spektra penicilīni (31.2%) un polimiksīni (24.7%), turklāt pamatā izmantota dzīvnieku grupveida ārstēšana, t.i., antimikrobiālās vielas pievienojot barībai vai ūdenim (82%) (Sarrazin et al., 2019). Parasti cūku ārstēšana *per os* tiek saistīta ar paaugstinātu rezistences attīstības risku (Varga et al., 2009), taču ir autori, kas savos pētījumos neguva šīs hipotēzes apstiprinājumu, uzsverot, ka ikviena antibiotiku terapija rada risku (Burow et al., 2019).

Nobarojamajām cūkām (20 nedēļu vecumā) novērojām būtisku rezistentu *E. coli* samazināšanos pret vairumu no testētajām antibiotikām – ampicilīnu, trimetoprimu un tā kombināciju ar sulfametoksazolu, tetraciklīnu, cefazolīnu, turklāt rezistence pret gentamicīnu un enrofloksacīnu netika konstatēta. Arī citi autori ziņo par rezistentā *E. coli* izplatības samazināšanos nobarošanas periodā (Akwar et al., 2008; Burow et al., 2019), kas tiek skaidrots ar būtisku ārstēšanas biežuma (8%) (Sarrazin et al., 2019) samazināšanos, īpaši, tuvojoties nokaušanas laikam, kad ir jāizvairās no antimikrobiālo līdzekļu atliekvielām cūkgaļā (Akwar et al., 2008).

Balstoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, lielajās saimniecībās novērojām būtiski augstāku pret antibiotikām rezistentā *E. coli* izplatības līmeni, salīdzinot to mazajās

saimniecībās. Mūsu rezultāti saskan ar vairākiem citu autoru ziņojumiem (Burow & Käsbohrer, 2017; Ström et al., 2017), ka cūku ganāmpulka lielumam ir pozitīva saistība (asociācija) ar rezistentā *E. coli* augstāku izplatību, taču būtiskāk atzīmēt, ka vairums pētnieku uzsver multifaktoru ietekmi uz rezistences veicinošiem apstākļiem (Dewulf et al., 2007; Dohmen et al., 2017). Turklāt kādā nesenā pētījumā Taizemē, augstāka rezistentā *E. coli* izplatība tika konstatēta tieši vidēja, nevis liela izmēra saimniecībās (Dawangpa et al., 2022), tādējādi, lai arī lielajās saimniecībās ir vairāk veicinošu apstākļu augstākai rezistentā *E. coli* izplatībai, tas nav noteicošais faktors, ko atklāj arī mūsu pētījumā novērotās būtiskās atšķirības rezistentā *E. coli* izplatībai starp fermām kopumā.

Multirezistentu baktēriju rašanās rada būtisku apdraudējumu ne tikai dzīvnieku veselībai, bet visai sabiedrībai (Aarestrup, 2005; Tanwar et al., 2014). Ja salīdzinām multirezistentā (MDR) *E. coli* izplatību atkarībā no saimniecības lieluma, tad būtiski augstāku izplatību konstatējam lielajās (42.4%) saimniecībās salīdzinot ar mazajām (2%), turklāt, līdzīgi kā ar rezistentā *E. coli* izplatības samazināšanos cūku ražošanas cikla laikā, arī MDR *E. coli* izplatība samazinājās cūku nobarošanas periodā. Ström ar līdzautoriem (Ström et al., 2017) kā vienu no iemesliem augstākai MDR *E. coli* izplatībai uzsvēra daudzveidīgāku antimikrobiālo līdzekļu izmantošanu cūku ārstēšanai lielāka izmēra ganāmpulkos, kas tika konstatēts arī mūsu pētījuma ietvarā. Multirezistentu baktēriju, t.sk., *E. coli* atslasi sekmē antimikrobiālo līdzekļu lietošana kombinācijās, turklāt, pētnieki ir konstatējuši, ka antimikrobiālo līdzekļu lietošana kopā ar barību būtiski palielina MDR *E. coli* izplatību (Varga et al., 2009). Interesanti novērojumi tika konstatēti kādā pētījumā Taizemē, kur augstāka (95.7%) MDR *E. coli* izplatība tika novērota vidēja lieluma (500-5000 cūkas) saimniecībās nekā lielajās (>5000 cūkas) saimniecībās – 87.7%, kas tika skaidrots ar efektīvāku biodrošības vadību un regulārākām veterinārārsta vizītēm saimniecībā (Dawangpa et al., 2022).

Kopumā pētījumā iekļautajās septiņās cūkkopības saimniecībās atklājām 89 dažādus rezistentā *E. coli* fenotipus. Visbiežāk konstatētais fenotips TE (19%) bija rezistents tikai pret vienu antibiotiku, t.i., tetraciklīnu, bet tai pašā laikā – 37% no visiem fenotipiem saturēja rezistenci pret fluorohinoloniem. Visbiežāk novērotie MDR *E. coli* fenotipi bija AM-AMC-TE (6.5%, n=40) un AM-SXT-TMP-TE (4.9%, n=30). Viens no izolētajiem *E. coli* fenotipiem AM-CZ-GM-AMC-SXT-TMP-C-TE-ENO uzrādīja rezistenci pat pret 9 no 12 antibiotikām. Līdzšinējie citu autoru pētījumi atklāj ļoti lielu rezistentā *E. coli* fenotipu dažādību cūku populācijās (Akwar et al., 2008; Jahanbakhsh et al., 2016), taču vairums autori uzsver, ka biežāk izolētajos fenotipos dominē rezistence pret tādām antibiotikām kā bēta-laktāmi-sulfonamīdi-tetraciklīns. Piemēram, Akwar ar līdzautoriem biežāk izolēja fenotipu AMINO-BETA-SULF-TET (25.2%), kas bija rezistents pret aminoglikozīdiem, bēta-laktāmu antibiotikām, sulfonamīdiem un tetraciklīnu (Akwar et al., 2008).

4.1.2. ESBL producējošā *E. coli* sastopamība lielajās un mazajās saimniecībās, dažāda vecuma cūkām

Bēta-laktāmu antibiotikas ietekmē baktēriju šūnu sienīņu sintēzi, kā rezultātā tiek efektīvi kavēta to augšana, tādēļ šīs antibiotikas veiksmīgi pielieto infekcijas slimību ārstniecībā, kuru cēlonis ir gan Gram-pozitīvie, gan Gram-negatīvie mikroorganismi. Taču bēta-laktāmu, t.sk., plaša spektra šīs grupas antibiotiku intensīva vai nepareiza lietošana gan humānajā, gan veterinārmedicīnā ir izraisījusi ESBL producējošo baktēriju selekciju un izplatību. PVO ir norādījusi, ka pret trešās paaudzes cefalosporīniem rezistentie *Enterobacteriaceae*, t.sk., ESBL producējošie *E. coli* ir viena no pasaules nopietnākajām un kritiskākajām 21. gadsimta problēmām (WHO, 2017).

Mūsu pētījuma ietvarā cūkkopības saimniecībās kopumā atklājām zemu (1.46%) ESBL producējošā *E. coli* attiecību pret izolētajiem komensiālajiem *E. coli*. Līdzīgi dati sniegti arī Eiropas Komisijas zoonotisko un komensiālo indikatorbaktēriju antimikrobiālās rezistences

monitoringa (AMR monitoringa) programmas ziņojumā, proti, aklās zarnas fekāliju paraugos, kas iegūti no nobarojamām cūkām kautuvēs, ESBL producējošu komensālo *E. coli* izplatība tika konstatēta zema – 1.4% (EFSA & ECDC, 2020). Taču, saskaņā ar īpašu ESBL producējošo *E. coli* uzraudzības programmu, kuras laikā pielietoja selektīvās bagātināšanas procedūru, konstatēta augsta (34.3%) ESBL producējošo *E. coli* sastopamība nobarojamo cūku fekāliju paraugos, turklāt izplatības līmenis ir ļoti atšķirīgs (0.3-80.3%) starp ES valstīm (EFSA & ECDC, 2020). Mūsu pētījumā ESBL producējošo *E. coli* sastopamība pakāpeniski samazinājās cūku nobarošanas periodā. Visaugstākais ESBL producējoša *E. coli* izplatības līmenis tika konstatēts sivēnmātēm (41.6%), tad sekoja atšķirtie sivēni (35.1%) un viszemākais izplatības līmenis konstatēts nobarojamajām cūkām, kas svārstījās no 11.5% – 12 nedēļu vecām cūkām, līdz 8.2% – 20 nedēļu vecām nobarojamajām cūkām. Arī citi autori ir ziņojuši līdzīgas tendences, ka ESBL producējošu *E. coli* sastopamība ievērojami samazinās cūku ražošanas cikla laikā (Dohmen et al., 2015; Moor et al., 2021). Interesanti, jau iepriekš minētajā ES monitoringa programmā tika ziņots par ievērojami augstāku (42.3%) ESBL producējošo *E. coli* izplatību nobarojamo cūku fekāliju paraugos Latvijā salīdzinot ar mūsu rezultātiem. Viens no iemesliem, kas izskaidro būtiskās rezultātu atšķirības, varētu būt, ka ES monitoringā un mūsu pētījumā tika izmantotas atšķirīgas ESBL producējošo baktēriju noteikšanas metodes. Mūsu izmantotā metode neietvēra selektīvo bagātināšanas procedūru, kā rezultātā samazinās metodes jutīgums. Kādā pētījumā no Vācijas tika ziņots, ka, iekļaujot bagātināšanas procedūru, ESBL producējošo *E. coli* varot izolēt līdz pat divas reizes biežāk (Schmid et al., 2013). Turklāt kādā citā pētījumā, kas veikts Vācijā, tika konstatēts, ka dzīvnieku transportēšana un īpaši kautuves uzgaidāmās zonas ir būtiski riska faktori ESBL producējošo *Enterobacteriaceae* pārvešanai starp cūkām. Pētījumā konstatēja, ka 29.7% no cūkām, kas pirms transportēšanas nebija ESBL producējoša *Enterobacteriaceae* pārnēsātāji, tika pakļautas kontaminācijai transportēšanas un pirmskaušanas uzgaidāmās zonās. Tā kā mūsu pētījumā paraugi tika iegūti saimniecībās, dzīvnieki netika pakļauti ESBL producējošu *E. coli* uzņemšanai no transportēšanas un pirmskaušanas posma vides, no šajā zonā esošajiem dzīvniekiem, tādējādi sniedz patiesāku ESBL producējošo *E. coli* izplatības situāciju saimniecībās, bet jutīgākas testēšanas metodes izvēle būtu ļāvusi atklāt vēl lielāku ESBL producējošo *E. coli* skaitu cūku populācijā.

Mūsu rezultāti atklāj, ka saimniecības lielums varētu būt viens no riska faktoriem augstākai ESBL producējošo *E. coli* sastopamībai cūku fekālijās. Taču vienlaikus pret šo secinājumu ir jābūt piesardzīgiem, jo mūsu pētījumā abas saimniecības ar visaugstāko ESBL producējošo *E. coli* sastopamību bija novērojamas gan lielo (L1), gan mazo saimniecību grupā (S1). Turklāt konstatējām būtiskas ESBL producējoša *E. coli* izplatību atšķirības savstarpēji gan lielo, gan mazo saimniecību grupās. Autori pētījumos ir ziņojuši par vairākiem riska faktoriem, kas varētu veicināt ESBL producējošu *E. coli* augstāku sastopamību cūku fermās. Par būtiskākajiem riskiem uzskata lokālas ūdens apgādes sistēmas izmantošanu saimniecībā, trūkumus biodrošības pasākumu nodrošināšanā (ieejas higiēna, kaitēkļu apkarošana, lolojumdzīvnieku klātbūtne) un higiēnas (dezinfekcijas un mazgāšanas līdzekļu lietošana) prasību neievērošana, kā arī pārmērīga antibiotiku un īpaši cefalosporīnu grupas antibakteriālo līdzekļu lietošana (Dohmen et al., 2017; Gay et al., 2018). Lai arī mūsu pētījuma uzdevums nebija veikt detalizētu ESBL producējošo *E. coli* izplatības riska faktoru invērtējumu, daļēji arī ierobežotās informācijas un nelielā saimniecību skaita dēļ, taču novērojām cēloņsakarību starp palielinātu diarejas aktualitāti saimniecībā un plašāku antibiotiku lietošanu. Balstoties uz veiktajiem aptaujas rezultātiem, visās cūkkopības saimniecībās (L1, L2, L3 un S1), kur konstatējām ESBL producējošu *E. coli* klātbūtni, diarejas sastopamība sivēniem tika vērtēta kā “bieža” (L1, L2 un S1) vai “sporādiska” (L3), turklāt ārstēšanā tika izmantotas tādas antibiotikas kā amoksicilīns (L1, L2, S1), fluorhinoloni (L1, L3, S1) un/vai cefalosporīnu (L1, L3) grupas pārstāvji. Kā zināms, amoksicilīns cūkām ir pieejams iekšķīgi lietojama pulvera formā, kas paredzēts pievienot barībai vai dzeramajam ūdenim, taču, tā kā tam ir zema uzsūkšanās un biopieejamība (Reyns et al., 2009), tas rada lielu selektīvu spiedienu uz zarnu mikrobiotu, kas sekmē rezistences izplatīšanos (Burch & Sperling, 2018). Kādā pētījumā

Portugālē novēroja korelāciju starp amoksicilīna lietošanu cūkām un augstu ESBL producējošu *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju izplatību cūku fekālijās (Fournier et al., 2020). Savukārt ASV veiktajā pētījumā, izmantojot divu mēnešu vecu cūku modeļus, tika pētīta amoksicilīna ietekme uz zarnu trakta komensālo mikrobiotu. Tika atklāts, ka cūkām, ievadot amoksicilīnu *per os*, būtiski mainās zarnu mikrobioms jau 4. pētījuma dienā, būtiski palielinot rezistentu gēnu (*bla*_{TEM} un *bla*_{OXA}) kodējošo baktēriju īpatsvaru (Connelly et al., 2018). Fluorohinolonu loma ESBL producējošo *E. coli* izplatīšanas veicināšanā ir ziņota jau iepriekš (Basu & Mukherjee, 2018), kas arī varētu būt faktors augstākai ESBL producējošo *E. coli* sastopamībai L1, L3 un S1 saimniecībās. Turpretī, mūsu pētījumā iekļautajās divās mazajās saimniecībās (S2 un S3), kā arī vienā no lielajām saimniecībām (L4) diareja sivēniem tika novērota reti. Antibiotiku lietošana mazajās saimniecībās bija ļoti ierobežota, turklāt tika izvēlēti ne-bēta-laktāma grupas antibakteriālie līdzekļi; savukārt saimniecībā L4 antibiotikas, tai skaitā plaša spektra penicilīnu grupas antibiotikas, tika lietotas sporādiski, kas domājams, ir galvenais iemesls ESBL producējošo *E. coli* neesamībai šo saimniecību cūku fekālijās.

4.1.3. ESBL producējošā *E. coli* antimikrobiālā rezistence

Vērtējot ESBL producējošo *E. coli* fenotipisko antimikrobiālo rezistenci, novērojām būtiskas rezistences atšķirības starp lielajām un mazajām cūkkopības saimniecībām. No bēta-laktāma antibiotikām, lielo saimniecību cūkām biežāk novēroja rezistenci pret cefaleksīnu, cefotaksīmu un cefepīmu, savukārt mazās (S1) saimniecības cūkām – ceftazidīmu. Dažādu bēta-laktamāžu kodējošo gēnu klātbūtne ESBL producējošos *E. coli* izskaidro novērotās fenotipiskās rezistences atšķirības pret dažādām bēta-laktāmu antibiotikām. Bieži dažādi bēta-laktamāzes gēni ir līdzās lokalizēti baktērijām hromosomās vai plazmīdās, tādējādi ietekmē fenotipisko rezistenci, turklāt šobrīd ir aprakstītas 10 bēta-laktamāžu grupas (pamatojoties uz to aminoskābju sekvencēm) – CTX-M, TEM, SHV, SFO, PER, VEB, GES, TLA, BES un OXA (Bush & Jacoby). Mūsu pētījumā ESBL producējošie *E. coli* tika apstiprināti kā “ESBL producējoši”, gan, izmantojot fenotipisko apstiprināšanas testu (kombinēto disku tests), gan ģenētiski, nosakot vismaz viena ESBL gēna klātbūtni. Jāuzsver, ka tikai viens no ESBL producējošajiem *E. coli* izolātiem uzrādīja rezistenci pret cefoksitīnu un tas, apvienojumā ar fenotipisko rezistenci pret cefotaksīmu, varētu būt kā fenotipiskais kritērijs AmpC izmeklēšanai, taču jāņem vērā, ka rezistenci pret cefoksitīnu var izraisīt arī poru trūkums šūnas sienā (EUCAST, 2017b). Kā zināms, ESBL producējošās baktērijas veido paplašinātā spektra bēta-laktamāzes, kas hidrolizē lielāko daļu penicilīnu un cefalosporīnu, tostarp, oksimino-bēta-laktāmu grupas antibiotikas (trešās un ceturtās paaudzes cefalosporīnus), tāpēc nav pārsteidzoši, ka novērojām augstu rezistences līmeni pret tādām antibiotikām kā cefotaksīmu (100%) un cefepīmu (100%).

Lielākā daļa ESBL pieder pie bēta-laktamāžu A klases (Amber klasifikācija), kurus inhibē bēta-laktamāžu inhibitori (piemēram, klavulānskābe) (Prescott, 2013a), taču jāatzīst, ka mēs novērojām ESBL producējošajiem *E. coli* augstu rezistences līmeni pret amoksicilīnu-klavulānskābi (87%). Iemesls tam varētu būt saistīts ar bēta-laktamāzes gēna OXA-1 klātbūtni (Livermore et al., 2019). Lai apstiprinātu šo apsvērumu, ir nepieciešami turpmākie izmeklējumi, taču šis fenomens varētu būt saistīts arī ar mērķa bēta-laktamāžu hiperrazošanu vai relatīvo baktēriju šūnas sienas necaurlaidību (Rawat & Nair, 2010).

Paplašinātā spektra SHV un TEM bēta-laktamāzes raksturojas ar augstāku ceftazidīma nekā cefotaksīma hidrolītisko aktivitāti (Liakopoulos et al., 2016), savukārt CTX-M bēta-laktamāze – ar augstāku cefotaksīma nekā ceftazidīma hidrolītisko aktivitāti (Bonnet, 2004). Tā kā mūsu pētījumā lielajās saimniecībās ESBL producējošiem *E. coli* tika novērota būtiski augstāka gēna *bla*_{CTX-M} izplatība, savukārt mazajā saimniecībā – *bla*_{SHV} gēna klātbūtne, tas varētu būt ticams izskaidrojums dominējošai fenotipiskajai rezistencei pret cefotaksīmu lielajās saimniecībās un ceftazidīmu – mazajā saimniecībā.

No lielajām saimniecībām izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* novērojām rezistenci pret virkni ne-bēta-laktāma antibiotikām: trimetoprimu, sulfametaksazola-trimetoprimu, gentamicīnu, tetraciklīnu, enrofloksacīnu. Lielajās saimniecībās multirezistento fenotipu dominēšana tiek skaidrota ar bēta-laktamāzes gēnu, īpaši CTX-M, līdzāspastāvēšanu citiem rezistences gēniem (Zeynudin et al., 2018). Neviens no mūsu pētījumā izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* nebija rezistents pret imipenēmu un mecilīnu. ESBL producējošu *E. coli* rezistence pret karbapenēmiem ir ziņota ļoti reti, atsevišķi gadījumi – Vācijā (EFSA & ECDC, 2020) un Beļģijā (Garcia-Graells et al., 2020), kad tie tika izolēti no cūku fekālijām vai cūkgaļas. Mecilīns pieder pie plaša spektra penicilīnu (amidinopenicilīnu) klases antibiotikām, kas vēsturiski nav plaši izmantots veterinārmedicīnā, galvenokārt, tā zemās perorālās uzsūkšanās dēļ, taču jau 2015. gadā Johns Preskots mecilīnam saskatīja milzīgu potenciālu lietošanai veterinārmedicīnā, ievadot to parenterāli, dēļ tā zemās afinitātes pret bēta-laktamāzes enzīmiem. Mūsu pētījuma laikā ir sniegts mums zināmais pirmais ziņojums par ESBL producējošu *E. coli* jutību pret mecilīnu, kas izolēti no cūku fekālijām. Savukārt humānajā medicīnā pēdējos gados ir bijuši daudzi ziņojumi par ESBL producējošu *E. coli* (96.5%) un multirezistento *E. coli* (96.9%) augsto jutību pret mecilīnu (Fuchs & Hamprecht, 2019). Līdz ar to, kopš 2019. gada, Eiropas Zāļu aģentūra mecilīnu ir iekļāvusi A kategorijā jeb tā sauktā “Avoid” kategorijā – tas nozīmē, ka tas ir atļautas lietot humānā medicīnā, taču tās nav reģistrētas lietošanai veterinārmedicīnā (EMA et al., 2020).

Visi ESBL producējošie *E. coli*, kas tika izolēti no lielo saimniecību cūku fekālijām, tika klasificēti kā multirezistenti (MDR), turklāt vairums no tiem raksturojās ar plašiem multirezistences fenotipiem, t.i., 79% bija rezistenti pret sešām un vairāk antibiotiku klasēm. Pretstatā mazajā saimniecībā nevienam no izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli* nenovēroja rezistenci pret sešām vai vairāk antibiotiku klasēm, turklāt 16,7% netika klasificēti kā multirezistenti. Arī citi autori ir ziņojuši, ka no lielākām cūku saimniecībām biežāk tiek izolēti MDR ESBL producējošie *E. coli* nekā no mazajām saimniecībām (Ström et al., 2017). Detalizēta informācija par antibakteriālo medikamentu lietošanas veidu lielajās cūku saimniecībās mums nebija pieejama, taču mazajā saimniecībā (S1) galvenokārt izmantoja parenterālu individuālu cūku ārstēšanu. Domājams, perorāla grupas ārstēšana ar dzeramo ūdeni un barību (metafilakse), lielajās saimniecībās varētu būt ticams izskaidrojums augstākai MDR ESBL producējošu *E. coli* sastopamībai cūku fekālijās (Varga et al., 2009). Jāuzsver, ka tikai lielajās cūku saimniecībās izmantoja cinka oksīdu kā barības piedevu un tas varēja būt vērā ņemams faktors ekstensīvāku multirezistences fenotipu izplatībai lielajās cūku saimniecībās. Ir vairāki ziņojumi, ka augstas cinka oksīda devas iekļaušana cūku barības racionā var sekmēt antimikrobiālās rezistences un multirezistences fenotipu selekciju cūku zarnās (Ciesinski et al., 2018; Hölzel et al., 2012). Mūsu pētījums atklāj, ka audzējamām un nobarojamajām cūkām dominēja šaurāki multirezistences fenotipi ESBL producējošiem *E. coli*, salīdzinot ar atšķirtajiem sivēniem. Šaurāki multirezistences fenotipi audzējamām un nobarojamajām cūkām visdrīzāk bija saistīti ar ārējā selektīvā spiediena samazināšanos, ko izraisīja samazināta vai pat pilnīgi pārtraukta antimikrobiālo līdzekļu lietošana cūku nobarošanas periodā. Līdzīga tendence ir ziņota vairākos citu autoru pētījumos, ka multirezistento *E. coli* izplatība nobarojamo cūku populācijā būtiski samazinās salīdzinot ar zīdējsivēniem un atšķirtajiem sivēniem (Akwar et al., 2008; De Lucia et al., 2021). Kā iepriekš minēts, rezistento un tai skaitā multirezistento baktēriju klātbūtne atšķirtiņiem sivēniem tiek skaidrota ar plašāku antibiotiku lietošanu ārstēšanai un profilaksei, dēļ tā, ka jauniem dzīvniekiem ir paaugstināts zarnu infekciju risks, īpaši, ja tie tiek pakļauti dažādām stresa situācijām, piemēram, sivēnu atšķiršanai, metienu apvienošanai, barības un vides maiņai (Akwar et al., 2008). Savukārt sivēnmātes biežāk antibakteriālos līdzekļus saņem individuāli, ievadot tos parenterāli, kas varētu būt pozitīvs faktors rezistences izplatības ierobežošanai (Jensen et al., 2012). Tai pašā laikā sivēnmātēm dzīves laikā biežāk tiek izvēlētas dažāda veida pretmikrobu līdzekļu aktīvās sastāvdaļas (Lekagul et al., 2020), kas varēja veicināt ekstensīvāku multirezistento ESBL producējošu *E. coli* fenotipu selekciju, kā arī augstāku to izplatību.

4.1.4. ESBL kodējošo gēnu sastopamība izolētajos *E. coli* cūkkopības saimniecībās

Lai arī bēta-laktamāzes kodējošie gēni (*bla*) tiek iedalīti 10 grupās, tomēr ESBL *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijās biežāk konstatējami ir CTX-M, TEM un SHV (Bush & Jacoby). Kā minējam analizētajos rezultātos, tad visos fenotipiski apstiprinātajos ESBL producējošos *E. coli* konstatējam vismaz viena ESBL kodējošā gēna klātbūtni.

Mūsu pētījuma rezultāti atklāj, ka visizplatītākais bēta-laktamāžu kodējošais gēns izolētajos ESBL producējošajos *E. coli* bija *bla*_{TEM} (94%), taču tā izplatība pārsniedza *bla*_{CTX-M} (86%) tikai par 8%. Par paplašināta spektra bēta-laktamāžu kodējošo gēnu izplatību produktīvajiem dzīvniekiem Eiropā ir ziņojusi, piem., Silva ar līdzautoriem (Silva et al., 2019). Cūkām visbiežāk novēroja *bla*_{CTX-M-1} un CTX-M-15 apakštipus, kuri filogēnētiski pieder pie cefotaksimāzes CTX-M-1 grupas. Krietni retāk Eiropā cūku populācijā novēroja citas cefotaksimāzes grupas, t.i., CTX-M-9 grupa (5%) un CTX-M-2 grupa (3%) (Silva et al., 2019). Tā kā mūsu pētījuma ietvaros netika noteikti cefotaksimāzes CTX-M-2 un CTX-M-9 grupu kodējošo gēnu klātbūtne, tad *bla*_{CTX-M} gēnu izplatība varētu būt nedaudz augstāka Latvijas cūku populācijā. Līdzīgi kā mēs novērojam savā pētījumā, arī vairāki Eiropas zinātnieki ir konstatējuši augstu *bla*_{CTX-M} un *bla*_{TEM} izplatību cūku populācijā, un visbiežāk šie bēta-laktamāzes kodējošie gēni ir konstatēti esot kombinācijā (Barilli et al., 2019; Biasino et al., 2018; Von Salviati et al., 2014).

Mēs konstatējam atšķirības **bēta-laktamāzes gēnu sadalījumā starp lielajām un mazajām (S1) saimniecībām**. Cūku fekālijās no lielajām saimniecībām izolētajos ESBL producējošajos *E. coli* ievērojami biežāk konstatējam gēna *bla*_{CTX-M} klātbūtni kombinācijā ar citiem bēta-laktamāzes gēniem, savukārt mazajā saimniecībā S1 biežāk dominēja gēns *bla*_{SHV} kombinācijā ar pārējiem bēta-laktamāzes gēniem. Mūsuprāt, viens no galveniem iemesliem augstākai gēna *bla*_{CTX-M} izplatībai lielajās saimniecībās varētu būt profilaktiska cinka oksīda kā barības piedevas izēdināšana cūkām. Kādā nesenā pētījumā, izmantojot fekāliju mikrobioma modeli *in vitro*, tika atklāts, ka cinka oksīda pievienošana fekāliju suspensijai palielināja plazmīdu kodēto gēnu *bla*_{CTX-M} saturošu *E. coli* īpatsvaru salīdzinot ar pārējo mikrobiotu; turklāt cinks sekmēja rezistences gēnu ekspresiju *E. coli* celmos (Peng et al., 2020). Domājams, arī mūsu pētījumā iekļautajās lielajās saimniecībās cinks varēja sekmēt plazmīdās kodētu ESBL producējošo *E. coli* celmu izplatību, kā arī inducētu gēna *bla*_{CTX-M} ekspresiju.

4.1.5. ESBL kodējošo gēnu asociācijas ar fenotipisko rezistenci

Lai noskaidrotu sasaisti starp novēroto fenotipisko rezistenci ESBL producējošiem *E. coli* un ESBL gēnu izplatību cūkkopības saimniecībās, dziļāk izanalizējam atlasītos ESBL producējošos *E. coli* izolātus. Mūsu pētījumā novērojam pozitīvu asociāciju starp **gēna *bla*_{SHV}** klātbūtni un fenotipiski izpausto rezistenci pret amoksiciklīnu-klavulānskābi, ceftazidīmu un cefiksīmu. Savukārt, **gēnam *bla*_{CTX-M}** novērojam pozitīvu asociāciju ar fenotipisko rezistenci pret cefaleksīnu un vairākām ne-bēta-laktāma antibiotikām – enrofloksacīnu, tetraciklīnu, gentamicīnu, trimetoprimu un sulfametoksazolu-trimetoprimu.

Tā kā dažiem TEM un SHV bēta-laktamāžu mutantiem ir viena aminoskābes maiņa, tāpēc tie var ņemt pārsvaru pār pirmās paaudzes bēta-laktamāzes inhibitoriem (klavulānskābi) (Bush & Bradford, 2019; Cantón, Morosini, et al., 2008), kas varētu izskaidrot bieži novēroto rezistenci pret amoksicilīnu-klavulānskābi ESBL producējošiem *E. coli*. Bēta-laktamāzes kodējošā gēna *bla*_{SHV} un tā fenotipiski izpaustā rezistence pret ceftazidīmu tiek skaidrota ar Glu240Lys aizvietošanu, kā rezultātā novēro spēcīgāku hidrolītisko aktivitāti pret ceftazidīmu nekā cefotaksīmu (Liakopoulos et al., 2016). Tāpat mūsu pētījuma rezultāti atklāja **gēna *bla*_{SHV}** un cefiksīma rezistences pozitīvu asociāciju. Naziri ar līdzautoriem ir ziņojis par *E. coli* augstu rezistenci pret cefiksīmu vienlīdz bieži – gan saturot *bla*_{CTX-M}, gan *bla*_{SHV} (Naziri et al., 2020). Savukārt Livermors ar līdzautoriem konstatēja, ka rezistences līmenis pret perorāli lietojamo

cefiksīmu ir atkarīgs no konkrētā enzīma varianta (Livermore et al., 2011). Tādas *Shigella* spp. bēta-laktamāzes kā SHV-4, SHV-5, CTX-M-15 izraisīja augsta līmeņa rezistenci pret cefiksīmu, kamēr SHV-2 un CTX-M-9 – zema līmeņa rezistenci. Tas norāda uz specifisku SHV enzīmu variantu klātbūtni mūsu izolētajiem ESBL producējošajiem *E. coli*, taču šo enzīmu variantu noteikšanai nepieciešama gēnu *bla_{SHV}* sekvenčēšana.

Mēs novērojām pozitīvu asociāciju starp gēna *bla_{CTX-M}* klātbūtni un fenotipiski konstatēto rezistenci pret cefaleksīnu, taču vienlaikus negatīvu asociāciju cefaleksīnam ar gēna *bla_{SHV}* klātbūtni. Vairums paplašināta spektra bēta-laktamāzes ir īpaši aktīvas pret pirmās paaudzes cefalosporīniem (Paterson & Bonomo, 2005), kas arī izskaidro gēna *bla_{CTX-M}* pozitīvo asociāciju ar novēroto rezistenci pret cefaleksīnu. Interesanti, ka mūsu pētījumā cefaleksīns bija efektīvs pret SHV enzīmu. Līdzīgus novērojumus ziņojis Bedenic ar līdzautoriem (Bedenic et al., 2005), uzsverot cefaleksīna izturību pret SHV-2 enzīmu. Savukārt gēna *bla_{CTX-M}* pozitīvā asociācija ar rezistenci pret vairākām ne-bēta-laktāma antibiotikām varētu norādīt uz noteiktu multirezistences ESBL producējošo *E. coli* klonu izplatību. Galvenokārt ESBL gēni ir lokalizēti mobilajos ģenētiskajos elementos (piemēram, plazmīdās) un šajās plazmīdās bieži ir inkorporēti daudzi citi rezistences gēni, tādējādi nodrošinot līdzrezistenci ar aminoglikozīdiem, fluorohinoloniem, trimetoprimu-sulfametoksazolu, tetraciklīnu un citām antibiotikām (Balkhed et al., 2013; Ozgumus et al., 2008). Taču jāuzsver, ka visbiežāk tieši gēns *bla_{CTX}* ir saistīts ar ekstensīviem multirezistentajiem baktēriju celmiem (Zeynudin et al., 2018). CTX-M klonu dispersija un kopselekcija (co-selekcija) ir veicinājusi to izkliedi globāli, turklāt, tie tiek viegli pārnesti starp *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām kolonizācijas laikā (Cantón et al., 2012).

Pēdējos gados aizvien pieaug bažas par bēta-laktamāzes kodējošā gēna *bla_{CTX-M}* un plazmīdu mediētās hinolonu rezistences (PMQR) līdzāspastāvēšanu, tāpēc neapdomīga fluorohinolonu lietošana var izraisīt multirezistentu ESBL producējošo *E. coli* selekciju un ātru izplatīšanos starp komensālo mikrobiotu (Basu & Mukherjee, 2018). Vairākos ziņojumos ir norādīta spēcīga pozitīva asociācija starp PMQR un *bla_{CTX-M-1}* grupas gēniem ESBL producējošajiem *E. coli* pārstāvjiem (J. O. Kim et al., 2021; Salah et al., 2019). Turklāt, iekļaujot barības devā cinka piedevas, sivēniem tiek veicināta multirezistentu baktēriju pārpilnība, kā arī tas sekmē plazmīdās kodēto ESBL producējošo *E. coli* selektīvo augšanu un ekspresiju (Peng et al., 2020). Pēc mūsu domām, antibiotiku un cinka piedevu pievienošana ūdenim un barībai, kā arī tādu antibiotiku lietošana kā enrofloksacīns, cefalosporīni, varēja būt noteicošie faktori multirezistentu CTX-M (cefotaksimāzes) producējošo celmu atradnei un sekojošai augstajai izplatībai lielajās cūkkopības saimniecībās.

4.2. Probiotiku, griķu kliju un augu piedevas izbarošanas ietekme uz sivēnu veselību

4.2.1. Barības komponentu ietekme uz asins rādītāju izmaiņām sivēniem

Cūkkopības industrijā ir nozīmīgi pilnveidot dzīvnieku ēdināšanas stratēģiju, izmantojot dažādas probiotikas un augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļas, kas uzlabotu dzīvnieku veselības stāvokli, stimulētu augšanu un samazinātu antibiotiku lietošanu.

Gan uzsākot sivēnu ēdināšanas pētījumu, gan tā noslēgumā, dzīvniekiem visi seruma bioķīmiskie un hematoloģiskie rādītāji iekļāvās references intervālos, izņemot sārmaino fosfatāzi, kas pētījuma noslēgumā normas robežas pārsniedz nelielā apmērā (1-1.5%) tikai probiotiku (P) un augu (H) grupās, un nedaudz vairāk – kontroles (C) grupā (11.9%).

Asins serumā esošais enzīms sārmainā fosfatāze ir vairāku izoenzīmu summa, kuru galvenās izcelsmes vietas organismā ir kauli, aknas un zarnas (Sacher et al., 2000). Paaugstināts sārmainās fosfatāzes līmenis (bez ASAT paaugstinātām vērtībām) var norādīt uz intensīvu kaulu veidošanās procesu sivēniem, tāpēc tā līmenis ir ļoti augsts sivēnu augšanas fāzē, un tas samazinās līdz ar vecumu (Arouca et al., 2012). Saskaņā ar autoru (Egeli et al., 1998) sniegto ziņojumu vienu dienu veciem sivēniem, sārmainās fosfatāzes līmeņa intervāls ir robežās no

2152-7410 U L⁻¹, bet 21. dienu veciem – attiecīgi 832-1779 U L⁻¹, tādējādi uzskatām, ka, uzsākot pētījumu, visiem sivēniem sārmainā fosfatāze atbilst attiecīgā vecuma normas robežām. Mūsu pētījums noslēdzās sivēniem 56. dzīves dienā, bet, ņemot vērā, ka mums nebija pieejamas seruma bioķīmisko rādītāju normas astoņu nedēļu veciem sivēniem, tad tika izmantotas Klem et al. (2010) autoru ieteiktās, kas paredzētas 12 nedēļu vecu sivēnu seruma bioķīmisko rādītāju izvērtēšanai. Sārmainās fosfatāzes augstākā robežvērtība tika sasniegta 300 U L⁻¹. Taču, saskaņā ar Cooper (Cooper et al., 2014) sniegto ziņojumu, 6 nedēļu veciem sivēniem par normu tika uzskatīts 130-513 U L⁻¹, tādējādi arī mēs varam uzskatīt, ka nobīde no normas varētu būt nebūtiska. Turklāt, ņemot vērā, ka paaugstinātas sārmainās fosfatāzes vērtības serumā var norādīt uz palielinātu zarnu caurlaidību (J. Wang et al., 2021), tad varam secināt, ka zemāks sārmainās fosfatāzes līmenis serumā pētniecisko grupu sivēniem, kas saņēma probiotikas un/vai augu izcelsmes barības sastāvdaļas, varētu norādīt uz to spēju samazināt gremošanas trakta gļotādas caurlaidību un sekmēt tās integritāti sivēniem pēcātšķiršanas periodā.

4.2.2. Barības komponentu ietekme uz zarnu trakta mikrobiotu un rezistentā *E. coli* izplatību

Viens no svarīgākajiem sivēnu veselības priekšnosacījumiem kritiskajā periodā ir zarnu labvēlīgās mikrobiotas attīstība. Komensālā mikrobiota, kolonizējot zarnas un piesaistoties zarnu gļotādas slānim, novērš patogēno baktēriju kolonizāciju (O'Hara & Shanahan, 2006). Tā piedalās gremošanas procesos, ogļhidrātu fermentācijā, sekmē zarnu gļotādas nobriešanu, aizsargā pret patogēno mikroorganismu kolonizāciju, sintezē vitamīnus un sekmē imūnsistēmas attīstību, piedaloties tās indukcijā un funkcionēšanā (Kamada et al., 2013; O'Hara & Shanahan, 2006).

Mūsu pētījuma rezultāti atklāja, ka **probiotiku iekļaušana** barības devā palielināja *Lactobacillus* spp. skaitu sivēnu tievajā un resnajā zarnā. Probiotiku spēja palielināt *Lactobacillus* spp. skaitu zarnās ir dokumentēta arī citu autoru pētījumos (Liao & Nyachoti, 2017). Salīdzinot ar kontroles grupas sivēniem, probiotiku un griķu kliju iekļaušana sivēnu barības devā neizraisīja būtiskas *Lactobacillus* spp. un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita izmaiņas sivēnu zarnās, taču novērojām minimālu *Latobacillus* spp. pieaugumu tievās un resnās zarnas saturā, kā arī minimālu *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita samazināšanos resnajā zarnā.

Līdzšinējos pētījumos ir ziņots, ka **griķiem** piemīt prebiotikām līdzīga aktivitāte (Coman et al., 2013; Préstamo et al., 2003), kas var modulēt zarnu mikrobiotu, t.i., palielinot pienskābes baktēriju un samazinot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju (Préstamo et al., 2003) un *E. coli* skaitu (Coman et al., 2013; de Lange et al., 2010). No vienas puses, mūsu konstatēto nelielo *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita samazinājumu varētu izraisīt pienskābo baktēriju producētais laktāts, kā arī īso ķēžu taukskābju, galvenokārt, acetāta, propionāta, butirāta dēļ (X. Wang & Gibson, 1993; D. Zhang et al., 2019). No otras puses, griķu klijās koncentrējas vairāki fenoli, piemēram, epikatehīns, procianidīns B2, epikatehīna gallāts, rutīns, katehīns, izoviteksīns, hiperozīds un izokvercetīns (Kalinová et al., 2019), kuriem pierādīta antibakteriāla aktivitāte (Radovanović et al., 2013; L. Wang et al., 2013). Tādējādi, griķu klijās esošo fenolu antibakteriālā aktivitāte, domājams, bija vērsta ne tikai uz *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju samazināšanu, bet arī ietekmēja caur ūdeni uzņemto probiotiku darbības efektivitāti, proti, ierobežojot būtisku *Lactobacillus* spp. skaita pieaugumu, kā tas tika novērots, ja iekļāvām sivēniem barības devā tikai probiotikas.

Interesanti, pētījumā mūsu izvēlētā **augu kombinācija** (*U. dioica*, *P. major* un *H. perforatum*) samazināja *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju, taču būtiski neietekmēja *Lactobacillus* spp. skaitu gremošanas saturā. Zināms, ka vairums augi satur daudz aktīvas sastāvdaļas, kurām piemīt antibakteriālā darbība, tādēļ augus uzskata par vienu no

daudzsološākajām antibiotiku alternatīvām arī cūku audzēšanā (Omonijo et al., 2018). Lai gan Gram pozitīvo baktēriju struktūra nosaka, ka tās ir jutīgākas pret vairums augos esošajām antibakteriālajām vielām salīdzinot ar Gram negatīvajām baktērijām (Burt, 2004), komensālā mikrobiota (piem., *Lactobacillaceae* dzimtas baktērijas), sintezējot eksopolisaharīdus un, izmantojot bārkstiņas, saistās pie zarnu gļotu slāņa, kas atrodas uz epitēlija šūnu virsmas, un veido biomembrānas, tādējādi veidojot saimniekorganismā rezidējošo mikrobiotu nesalīdzināmi rezistentāku (Donaldson et al., 2016; Omonijo et al., 2018). Ar to varētu izskaidrot arī mūsu pētījumā izmantotās augu kombinācijas spēju sekmīgi modulēt zarnu mikrobiotu, samazinot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu, bet tai pašā laikā būtiski neietekmējot rezidējošo *Lactobacillus* spp. skaitu.

Uzsākot pētījumu (sivēnu 14. dzīves dienā), 35. dienā un tā noslēgumā (sivēnu 56. dzīves dienā) tika noteikta *E. coli* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita dinamika sivēnu fekālijās. Pirms pētījuma uzsākšanas, iegūtajos paraugos mēs nekonstatējām būtiskas *E. coli* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita izmaiņas starp dzīvnieku grupām.

Noslēdzoties pētījuma 3. nedēļai, (sivēnu dzīves 35. dienā) novērojām būtisku *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaita samazināšanos probiotiku grupā, taču pētījuma beigās – būtisku *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaita samazinājumu novērojām sivēniem, kuri saņēma pie pamatbarības augu piedevu. Arī probiotikas+griķu klijas būtiski samazināja *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju, kā arī samazināja *E. coli* ($p>0.05$) skaitu, salīdzinot, ja barības devā bija iekļautas tikai probiotikas.

Probiotiku pozitīvais efekts uz fekāliju mikrobiotu bija vērojams ātrāk, jau pēc trīs pētījuma nedēļām, t.i., nedēļu pēc sivēnu atšķiršanas. *In vitro* pētījumos pierādīts, ka probiotikas samazina gremošanas trakta pH, tādējādi samazinot patogēno baktēriju augšanu (Gibson, 1999). Augu piedevas efektu uz fekāliju mikrobiotu konstatējām pētījuma noslēgumā (sivēnu 56. dzīves dienā), samazinoties *E. coli* un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitam. Līdzīgus novērojumus konstatējuši arī citi pētnieki (Yan et al., 2012) pēc augu ekstraktu izēdināšanas sivēniem. Tā kā augi satur ēteriskās eļļas, tad tiem piemīt salīdzinoši spēcīga antimikrobiālā aktivitāte, īpaši fenola savienojumiem, kas iedarbojas uz vairums baktērijām, īpaši zarnu patogēniem, piem., *Salmonella* Typhimurium (Lambert et al., 2001), bet tai pašā laikā ar nelielu inhibīciju pret *Lactobacillus* spp. (Si et al., 2006).

Interesanti, bet mūsu pētījumā lietoto **augu un probiotiku+griķu kliju** komponentu efekts uz sivēnu fekāliju mikrobiotu bija vērojams pētījuma beigās, ko varētu skaidrot ar to, ka pēc atšķiršanas sivēni iziet tā saukto akūto un adaptīvo atšķiršanas fāzi. Tā kā primārais akūtās fāzes efekts ir samazināta barības uzņemšana, tad var paiet pat septiņas dienas, līdz atšķirtie sivēni iemācās ēst sauso barību un uzņemtās sausas saturs sasniedz tādu apjomu, kāds tas bija pirms atšķiršanas (Pluske et al., 1997). Ņemot vērā, ka H un PB grupas sivēni saņēma papildus komponentus pie pamatbarības un iepriekš minēto faktu, mūsaprāt, mūsu pētījumā iekļautie sivēni neuzņēma pietiekami daudz ar augu izcelsmes barības sastāvdaļām papildināto barību, lai novērotu to labvēlīgo ietekmi uz fekālo mikrobiotu jau sivēnu 35. dzīves dienā. Savukārt probiotiku, kas tika pievienotas pie dzeramā ūdens, iedarbība bija novērojama ātrāk – jau sivēnu atšķiršanas akūtajā fāzē.

Barības komponentu ietekme uz rezistentā *E. coli* izplatību. Mūsu pētījumā neviena no sivēnu grupām nesaņēma antibiotikas ne ārstēšanas, ne arī profilakses nolūkā, taču tai pašā laikā novērojām augstu izolētā *E. coli* rezistenci pret ampicilīnu (42%) un trimetoprimu (33%) 14 dienu veciem sivēniem (pirms pētījuma uzsākšanas) un augstu rezistenci pret ampicilīnu, tetraciklīnu, trimetoprimu un trimetoprimu-sulfametoksazolu 56 dienu veciem sivēniem visās pētnieciskajās grupās. Zīdējsivēniem zarnu mikrobiotas attīstībā būtiska loma ir apkārtējās vides un zīdējmātes mikrobiotas ietekmei (Langlois et al., 1986). Pētnieki ir novērojuši, ka augstā rezistence no jaunu dzīvnieku gremošanas trakta izolētajām baktērijām ne vienmēr ir saistīta ar antibiotiku izmantošanu, bet gan saistīta ar ģenētiskās rezistences elementu plašo izplatību zarnu mikrobiotas vidū, turklāt, pārejot uz bez-antibiotiku cūku audzēšanu, var samazināt rezistentu izolātu izplatības līmeni, taču, visticamāk, pilnīgi eliminēt pret

antibiotikām rezistentos gēnus fekāliju mikrobiotā neizdosies (Mathew, 2001). To atklāj arī mūsu pētījuma rezultātos novērotais augstais rezistences līmenis pret hloramfenikolu izolētajiem *E. coli* no kontroles grupas sivēniem. Hloramfenikols ES ir aizliegts lietot produktīvo dzīvnieku ārstēšanai jau kopš 1994. gada. Neskatoties uz to, ka atsevišķas antibiotikas nav lietotas pat vairākus gadu desmitus, to rezistentie gēni var saglabāties apkārtējā vidē. Pateicoties tam, ka šie rezistentie gēni nereti ir integrēti baktēriju mobilajos ģenētiskajos elementos (plazmīdās) un hromosomās – gēnu kasešu veidā, tāpēc atsevišķu antibiotiku lietošana var sekmēt rezistences veidošanos pret tādām antibiotikām, kas dzīvnieku ārstēšanai netiek lietotas jau ļoti ilgu laiku (Diarra et al., 2007). Otrkārt, rezistenci pret hloramfenikolu var veicināt arī florfenikola lietošana cūkām elpošanas infekciju kontrolei, un, saskaņā ar lietošanas instrukciju, tas ir kontrindicēts laktējošiem un grūšniem dzīvniekiem. Florfenikola rezistences gēns *floR* spēj nodrošināt krustenisko rezistenci arī pret hloramfenikolu (Schwarz S. et al., 2006) un nereti tas tiek identificēts baktērijām, kuras izolētas no cūkām (Pissetti et al., 2017).

Kā minējām, pētījuma laikā sivēniem antibiotikas netika lietotas, kā rezultātā vērojama kāda pozitīva tendence, proti, pirms sivēnu ēdināšanas pētījuma izolētā *E. coli* rezistence pret vismaz vienu antibiotiku tika novērota 66.7% gadījumu, bet pēc pētījuma vērojama neliela rezistences samazināšanās, t.i., 50% no izolētajiem *E. coli* novēroja rezistenci. Taču, tā kā šajā saimniecībā sivēniem pēcatšķiršanas periodā tiek lietots cinka oksīds augstās devās (1000 mg kg⁻¹), tas visticamāk izskaidro augsto MDR *E. coli* izplatību pētniecisko grupu sivēniem. Smago metālu loma multirezistentu baktēriju selekcijā sivēnu gremošanas traktā un vidē ir plaši aprakstīta zinātniskajā literatūrā (Bednorz et al., 2013; Ciesinski et al., 2018). Mūsuprāt, cinka oksīds ir sekmējis MDR baktēriju augsto izplatību saimniecības vidē, kas ietekmējis arī mūsu pētījuma rezultātus. Taču neskatoties uz to, salīdzinot no pētnieciskajām grupām izolēto rezistentu *E. coli* fenotipisko dažādību pētījuma noslēgumā, visvairāk to variācijas tika novērotas kontroles grupas sivēniem, taču novērojām tendenci samazināties to variācijām probiotiku un īpaši augu, probiotiku+griķu kliju grupu fekālijās esošajiem *E. coli*.

Ir autori, kas novērojuši probiotiku antagonisku ietekmi uz antibiotiku rezistentu gēnu pārnesanu, taču šis iedarbības mehānisms joprojām ir neskaidrs (Moubareck et al., 2007). Kādā citā pētījumā novērtēja divu *E. coli* probiotiku celmu (ED1a un Nissle 1917) ietekmi uz ESBL producējošā *E. coli* pārnesi vai izdalīšanos, proti, probiotikas tika iekļautas sivēnmāšu barības devā 12 dienas pirms atnešanās un sekojoši sivēniem no dzimšanas līdz 49 dienu vecumam. Sekojoši pētījumā sivēni tika perorāli inokulēti ar *E. coli*, kas satur *bla*_{CTX-M-1}. Probiotikas būtiski nesamazināja ESBL producējošā *E. coli* izdali, taču, analizējot paraugus *post mortem*, tika atklāta neliela, bet būtiska ESBL producējošā *E. coli* populācijas samazināšanās resnajā zarnā (Mourand et al., 2021). Taču jāņem vērā, ka arī probiotikas var saturēt pret antibiotikām rezistentos gēnus (Das et al., 2020). Tādējādi, probiotikas ir kā “abpus griezīgs zobens”, neskatoties uz probiotiku labvēlīgo ietekmi – uzlabojot dzīvnieku veselības rādītājus, samazinot nepieciešamību pret antibiotikām un tādējādi mazinot to radīto selektīvo spiedienu; ir jāpatur prātā ar probiotikām saistītie riski – dažu probiotiku celmu spēju nodot rezistentos gēnus patogēniem, izmantojot horizontālo gēnu pārneses mehānismus (Imperial & Ibana, 2016).

Mēs redzam, ka arī augu piedeva samazina resistentu *E. coli* fenotipisko dažādību, taču plašāki pētījumi nepieciešami darbības mehānismu noskaidrošanai. Vairums autori savos pētījumos noliedz augu izcelsmes līdzekļu spēju attīstīt baktērijām rezistenci, galvenokārt, to kompleksā aktīvo vielu sastāva dēļ (Becerril et al., 2012; Hammer et al., 2012), tomēr, ir bijuši ziņojumi par spēju veicināt rezistences attīstību, ja tiek izmantota kāda viena konkrēta augu izcelsmes aktīvā viela ar noteiktu mērķi baktēriju šūnā (Kisluk et al., 2013).

4.2.3. Zarnu histomorfoloģiskais raksturojums barības komponentu ietekmē

Zarnu epitēlijs un imūnās šūnas kopā ar gļotu slāni nodrošina pirmo barjeru pret zarnu mikrobiotu, patogēniem un ārējiem antigēniem. Atšķiršana no sivēnmātes, sivēniem izraisa stresu, turklāt, vides, barības un sociālās hierarhijas maiņa padara to par kritisko periodu cūku dzīvī; tas izraisa kuņģa-zarnu trakta disfunkciju, gļotādas barjeras noārdīšanos un rezultējas ar zarnu iekaisumu un diarejas attīstību (Moeser et al., 2007).

Histopatoloģiskās izmeklēšanas laikā visu pētniecisko grupu, 56 dienu vecu sivēnu tievo (*jejunum*) un resno (*colon*) zarnu histoloģiskajos griezumos novērojām vieglu līdz mērenu hronisku, difūzu enterokolītu ar vieglu līdz mērenu eozinofilo leukocītu, limfocītu un plazmocītu infiltrāciju. Kā minēts iepriekš, atšķiršanas perioda izraisīts stress, izmaiņas sivēnu uzturā un vidē, var rezultēties ar ievērojamām funkcionālām un morfoloģiskām izmaiņām sivēniem kuņģa-zarnu traktā, ko mēdz saukt par “ar atšķiršanu saistītu zarnu iekaisumu” (Moeser et al., 2007). Sivēniem pēc atšķiršanas ir raksturīgi novērot hronisku enterītu ar dažādu iekaisuma šūnu, īpaši, mononukleāro šūnu infiltrāciju gļotādas pamatkārtā (*lamina propria mucosae*) (Hampson, 1986; Papadopoulos et al., 2017). Salīdzinoši biežāk un augstākā pakāpē (nedaudz līdz mēreni) eozinofilo leukocītu infiltrāciju novērojām tievajā zarnā, taču tai pašā laikā parazitāru klātbūtne netika konstatēta. Citi autori ir ziņojuši līdzīgus rezultātus, ka eozinofilo leukocītu infiltrācija ir raksturīga veselām cūkām; augstākā pakāpē tievajā zarnā (īpaši daudz tievās zarnas *ileum* daļā) un mazā apjomā resnajā (*colon*) zarnā (Duncker et al., 2006). Kā ziņoja Kato ar līdzautoriem, eozinofilie leukocīti ir ne tikai alerģijas un parazitārās invāzijas izraisīta iekaisuma efektorās šūnas, bet arī darbojas kā imūnmodulējošās šūnas tievajā zarnā (Kato et al., 1998). Savukārt, neitrofilo leukocītu infiltrācija dažās resnās zarnas kriptās bija saistīta ar vieglu kriptosporīdiju invāziju, ko apliecina arī citu autoru ziņojumi (Zadrozny et al., 2006). Mēs novērojām minimālu baktēriju daudzumu ne tikai uz tievās zarnas bārkstiņu virsmas, bet arī atsevišķās kriptās, īpaši sivēniem, kuriem barības devā bija iekļautas probiotikas un probiotikas+griķu klijas. Tāpat nedaudz līdz mēreni daudz baktēriju konstatējām uz resnās zarnas gļotādas virsmas, bet kriptās – lielākoties probiotiku un probiotiku+griķu kliju grupu sivēniem. Zarnu mikrobiota normālos apstākļos veido biomembrānas virs gļotu ārējā slāņa, taču iekšējo slāni uzskata par nosacīti sterilu (Buret et al., 2019; Donaldson et al., 2016). Samazināta barības uzņemšana pēc sivēnu atšķiršanas un uzturvielu trūkums gremošanas traktā izraisa akūtas izmaiņas zarnu fizioloģijā un ietekmē arī rezidējošo mikrobiotu (Lallès et al., 2007). Attiecīgi biomembrānu fragmenti un oportūniskie patogēni šķērso gļotu barjeru, piesaistās pie epitēlija šūnām un sekojoši pārvietojas caur šūnām paracelulāri. Patobionti aktivizē saimniekorganisma imunitāti un izraisa iekaisumu (Buret et al., 2019). Taču baktēriju klātbūtnei varētu būt arī cits izskaidrojums. Pētījumos ir pierādīts, ka arī vairākas baktērijas, tostarp *Lactobacillus* spp., spēj izdzīvot tuvu epitēlija virsmai, lokalizējoties uz gļotu iekšējā slāņa un pat kriptās. Baktēriju klātbūtnei šajās nišās ir izšķiroša nozīme, lai veicinātu imūno homeostāzi, aizsargātu rezidējošo mikrobiotu no konkurējošiem mikroorganismiem un atjaunotu sākotnējo baktēriju kopienu zarnu lūmenā pēc dažādiem zarnu ekosistēmas izaicinājumiem (barības uzņemšanas traucējumi, kuņģa-zarnu trakta motorikas novirzes, antibiotiku lietošana) (Donaldson et al., 2016). Mēs konstatējām, ka sivēniem, kuri saņēma probiotikas ar dzeramo ūdeni, biežāk tika novērota kokveida un nūjiņveida baktēriju klātbūtne kriptās. Ņemot vērā, ka netika konstatēta būtiski augstāka zarnu iekaisuma pakāpe dzīvniekiem, kas saņēma probiotikas, domājams, ka to iekļaušana sivēnu diētā ir sekmējusi labvēlīgo baktēriju piesaisti sivēnu zarnās šīm specifiskajām nišām. Turklāt, novērotais minimāls līdz mērens hronisks difūzs enterokolīts visu grupu sivēniem varētu būt sivēnu zarnu nobriešanas procesa rezultāts, kuras attīstību ir sekmējušas izmaiņas ēdināšanā un jaunie apstākļi pēc atšķiršanas periodā.

Tādi tievās zarnas **histomorfoloģiskie mērījumi**, kā, piemēram, bārkstiņu augstums (VH), kriptu dziļums (CD) un to attiecība ir svarīgi zarnu veselības stāvokļa informatīvie rādītāji (Han et al., 2013). Augstākas bārkstiņas nodrošina lielāku enterocītu skaitu, un to

mikrobārktstīņas palielina virsmas laukumu; tiek sekmēta mikrobārktstīņu enzīmu ekspresija, tādējādi uzlabojas gremošanas funkcija, bet palielināts virsmas laukums uzlabo barības vielu absorbciju un transportēšanu (Awad et al., 2009). Kriptās lokalizējas epitēlija cilmes šūnas, kas nodrošina epitēlija šūnu proliferāciju. Enterocītu proliferācija un diferenciācija nodrošina bārktstīņu pārklāšanu un augšanu; turklāt, tiem ir galvenā loma lokālās un sistēmiskās imūnās atbildes reakcijās (Holgate, 2007; Uni, 2006). Savukārt, VH:CD attiecība bieži tiek izmantota, lai objektīvi novērtētu histoloģiskos mērījumus. Lielāka VH:CD attiecība galvenokārt tiek vērtēta pozitīvi, jo palielinās absorbējošās virsmas laukums un tai pašā laikā samazinās audu aprites ātrums (Munyaka et al., 2012). Mūsu pētījumā novērojām, ka augu piedeva pievienošana pie pamatbarības palielināja bārktstīņu augstumu un VH:CD attiecību. Arī citi autori ir ziņojuši par augu labvēlīgo efektu uz zarnu histomorfoloģiskajiem rādītājiem gan cūkām (Zou et al., 2016), gan putniem (Hajiaghapour & Rezaeipour, 2018). Augu un to ēterisko eļļu labvēlīgā ietekme uz zarnu histomorfoloģiskajiem rādītājiem galvenokārt tiek saistīta ar to spēju samazināt baktēriju radīto slodzi zarnās (Zeng et al., 2015). Taču jāsaprot, ka, neskatoties uz to, ka augu piedeva pozitīvi ietekmēja zarnu bārktstīņu augstumu un VH:CD attiecību, novērojām arī lielāku bārktstīņu platumu. Windisch ar līdzautoriem ir minējis (Windisch et al., 2007), ka augu ēteriskajām eļļām var būt divējāda iedarbība zarnu lūmenā, t.i., no vienas puses tās spēj samazināt baktēriju izraisīto spiedienu, kas rezultējas ar palielinātu bārktstīņu augstumu un attiecīgi palielinās absorbcijas laukums; taču no otras puses, daudzas augu ēteriskās eļļas var izraisīt zarnu audu kairinājumu, tādējādi zarnu virsmas laukums var pat samazināties. Arī probiotikas uzlaboja bārktstīņu augstumu un palielināja VH:CD attiecību, tādējādi pozitīvi ietekmēja tievo zarnu morfoloģijas attīstību. Probiotikas, nonākot sīvēnu zarnās, veic adhēziju pie gļotu slāņa un enterocītiem, kolonizējas un veido noteiktas nišas zarnās, izraisot tā saukto “kolonizācijas rezistenci”, rezultātā aizsargājot zarnu bārktstīņas pret patogēniem, turklāt, samazināta toksicitāte un labāka barības vielu uzsūkšanās, var veicināt bārktstīņu augšanu un atjaunošanos (Donaldson et al., 2016; Song et al., 2014). Mēs nenovērojām būtisku barības komponentu ietekmi uz kriptu dziļumu tievās zarnas *jejunum* daļā; taču visās grupās, kurās tika iekļautas barības papildus sastāvdaļas, novērojām lielāku Ki67 pozitīvu enterocītu blīvumu. Līdzīgus rezultātus novēroja arī citi pētnieki pēc oligosaharīdu izēdināšanas atšķirtajiem sīvēniem (Suthongsa et al., 2017). Savukārt, resnās zarnas *colon* daļā, visās sīvēnu grupās, kas saņēma kādu no papildus komponentiem, novērojām augstāku kriptu dziļumu. Ņemot vērā, ka griķu klijas un augu piedeva satur polisaharīdus, kam piemīt prebiotikām līdzīgas īpašības (Kamada et al., 2013; Yahfoufi, Mallet, et al., 2018), pienskābes baktērijas to izmanto īso ķēžu taukskābju (acetāta, propionāta un butirāta) ražošanai, kas ir svarīgs enerģijas avots kolonocītu augšanā (Hooper et al., 2002). Turklāt butirāts ir aktīvs iekaisuma inhibitors, kā arī tas stimulē gļotādas atjaunošanos (Cornick et al., 2015).

Gan tievajā, gan resnajā zarnā, starp cilindrisko apmaloto epitēliju atrodas izkaisītas **kausveida šūnas**. Tās sekretē glikoproteīnus, kas veido gļotu slāni un pārklāj epitēlija šūnas. Tievajā zarnā ir viens gļotu slānis, savukārt resnajā zarnā gļotu slānis sastāv no divu slāņu sistēmas – iekšējais ir blīvs un praktiski sterils, savukārt ārējais – ir irdens un veido zarnu mikrobiotas ekosistēmu (Johansson et al., 2008). Tā ir pirmā “aizsardzības līnija” iedzimtai saimnieka aizsardzībai pret eksogēniem un endogēniem kairinātājiem, kā arī pasargā no patogēnu adhēzijas un invāzijas, bet vienlaicīgi tā ļauj veikt ūdens, gāzu un barības vielu transportu (Hasnain et al., 2013).

Kausveida šūnu ražotie glikoproteīni tiek iedalīti neitrālajos un skābajos apakštipos. Neitrālo mucīnu oligosaharīdu ķēdes satur glikozi, galaktozi, mannozi vai fruktozi; savukārt skābie mucīni parasti satur gan sialskābi, gan sulfātskābes grupas, taču galējo klasifikāciju nosaka dominējošā grupa (Robertson & Wright, 1997). Gan skābie, gan neitrālie mucīni palielina gļotu slāņa viskozitāti epitēlija aizsardzībai, taču skābie mucīni – specifiski aizsargā pret baktēriju translokāciju (Cao & Wang, 2009).

Mēs pētījumā novērojām, ka **probiotikas** palielināja kausveida šūnu daudzumu resnās zarnas *colon* daļā, turklāt sekmēja to diferenciāciju, palielinot skābo mucīnu producējošo šūnu

skaitu. Par probiotiku spēju palielināt kausveida šūnu proliferāciju un diferenciāciju ir ziņojuši arī citi autori. Sterilām pelēm (germ-free) kausveida šūnu skaits tievajā zarnā palielinājās pēc konvencionalizācijas ar fekālo mikrobiotu (El Aidy et al., 2013). Pakļaujot sivēnus enterotoksiogēnā *E. coli* (ETEC) iedarbībai, kausveida šūnu skaits sivēnu zarnās samazinājās, bet sivēniem, kuri pirms ETEC *E. coli* apstrādes bija saņēmuši mērenu devu *Bacillus* probiotisko maisījumu, kausveida šūnu skaits bija augstāks (W. Zhang et al., 2017). Kādā citā pētījumā probiotikas palielināja kausveida šūnu skaitu tievo un resno zarnu kriptās nobarojamajām cūkām; turklāt, divpadsmitpirkstu un resnajā zarnā novēroja skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaita palielināšanos (Desantis et al., 2019). Zinātnieki ir mēģinājuši izskaidrot, kā mikrobiota un probiotikas var ietekmēt kausveida šūnu proliferāciju un sekmēt mucīna paskābināšanos. Baktērijas, kolonizējot gļotas, var izmantot mucīnu kā oglekļa, slāpekļa un enerģijas avotu (Meslin et al., 1999). Baktērijas, atbrīvojot dažādus mucīnu fermentācijas galaproduktus, dažādus sekrēcijas metabolītus un bioaktīvos faktorus, aktivizē dažādas signalizācijas kaskādes un sekrēcijas elementus, tādējādi iedarbojoties uz kausveida šūnām. Piemēram, mikrobiota var atbrīvot proteolītisko enzīmu, meprīnu β , kas atrodas uz enterocītu apikālās membrānas. Meprīns β šķel MUC2 mucīna N-gala reģionu un atbrīvo mucīnu no kausveida šūnām (Schutte et al., 2014). Turklāt baktēriju struktūras elementi, piemēram, lipopolisaharīdi (LPS), flagellīns A, lioteicoīnskābes (LTA) un vairāki metabolīti (SCFA, adenoīna trifosfāts) spēj regulēt mucīna gēna ekspresiju, tādējādi ietekmējot saimniekorganisma imūnās atbildes reakcijas (Dharmani et al., 2009).

Ir pierādīts, ka $\gamma\delta$ T limfocītiem ir svarīga loma zarnu gļotu slāņa homeostāzes uzturēšanā – regulējot mucīna ekspresiju un sekmējot kausveida šūnu darbību. Pie samazināta $\gamma\delta$ T limfocītu skaita novēro gan siālskābi saturošu mucīna, gan kausveida šūnu skaita samazināšanos (Kober et al., 2014). Cūkām intraepiteliālie limfocīti (IEL) pieder pie $\gamma\delta$ T limfocītu populācijas (Vega-López et al., 1993). Mēs konstatējām, ka probiotikas palielināja IEL skaitu tievo zarnu *jejunum* daļā. Probiotiku strukturālie elementi (LPS, LTA) ir svarīgi iedzimtās un adaptīvās imunitātes stimulatori (Dharmani et al., 2009) un varētu būt atbildīgi par palielinātu IEL skaitu. Tāpēc kausveida šūnu palielinātais daudzums un gļotu paskābināšanās ir skaidrojama ar izmantoto probiotiku imūnstimulējošo darbību; taču tai pašā laikā nevar izslēgt mūsu pētījumā izmantoto probiotiku spēju tieši ietekmēt kausveida šūnas.

Probiotiku+griķu kliju ietekme uz kausveida šūnu skaita palielināšanu un mucīna modulāciju nebija tik būtiska, salīdzinot, ja tika izmantotas probiotikas, kā vienīgā barības piedeva. Iespējams, tas varētu būt saistīts ar griķu klijs esošo iepriekšminēto polifenolu klātbūtni un to inhibējošo iedarbību uz izmantotajām probiotikām.

Mūsu izmantotā **augu** piedeva samazināja kausveida šūnu blīvumu; turklāt, tievās zarnas *jejunum* daļā samazinājās gan skābo, gan neitrālo mucīnu ražojošo šūnu skaits. Lai arī literatūrā ir pieejama ierobežota informācija tieši par augu tiešo ietekmi uz kausveida šūnu skaitu; tomēr noskaidrota vispārēja sakarība, ka mazāka mikrobiotas slodze samazina kausveida šūnu skaitu un to lielumu (Kandori et al. 1996), tādējādi norādot par augu labvēlīgo ietekmi uz mikrobiotu. Augu piedevu antimikrobiālā aktivitāte ir plaši pētīta; vairums no tiem uzrāda inhibējošu iedarbību pret tādiem biežākajiem patogēniem kā koliformām, *E. coli* un *Clostridium perfringens* (Zeng et al., 2015). Turklāt, arī mūsu rezultāti norādīja uz lietotās augu kombinācijas spēju samazināt *Enterobacteriaceae* un *E. coli* skaitu sivēnu fekālijās pēc atšķiršanas periodā. Tādējādi, pēc mūsu domām, augu piedevas ietekme uz kausveida šūnu blīvuma samazināšanos varētu tikt skaidrota ar šo augu piedevu spēju samazināt mikrobiotas radīto slodzi uz zarnu gļotādas imunitāti. Turklāt, izbarojot sivēniem augu piedevu, tika novērots arī zemāks IEL skaits tievās zarnas *jejunum* daļā.

Pamatojoties uz mūsu pētījuma **imūnhistohīmisko izmeklējumu rezultātiem**, varam apgalvot, ka **probiotikas** palielināja epitēlija šūnu (Ki67+) proliferāciju tievās zarnas *jejunum* daļas kriptās, bet augu piedeva, kā arī probiotikas+griķu klijas – palielināja proliferāciju gan *jejunum*, gan *colon* daļu kriptās. Kā zināms, ar integrīnu saistītajai kināzei ir izšķiroša loma, lai stabilizētu enterocītus pret kustību kriptu-bārkstiņu virzienā, ietekmējot fibronektīna

nogulsnēšanos bazālajā membrānā, tādējādi kontrolējot enterocītu proliferāciju, izplatīšanos un migrāciju (Gagne et al., 2010). Savukārt Preidis ar līdzautoriem ir novērojuši, ka atsevišķi probiotiku celmi samazina ar integrīnu saistītās kināzes gēna ekspresiju enterocītos un tādēļ samazinās citoskeleta β -aktīna līmenis bazālajā membrānā; tas sekojoši destabilizē enterocītu mijiedarbību ar šo bazālo membrānu un palielina šūnu migrācijas ātrumu gar kriptu-bārkstiņu asi (Preidis et al., 2012). Turklāt probiotikas palielināja šūnu proliferāciju kriptās (Preidis et al., 2012). Citi autori ir ierosinājuši, ka daži probiotiku celmi var pastiprināt šūnu proliferāciju, mijiedarbojoties un regulējot zarnu cilmes šūnas (Preidis et al., 2012; Walker et al., 2009). Ir pētījumi, kuros ir uzsvērtā laktāta (to ražo pienskābās baktērijas resnās zarnas proksimālajā daļā) kritiski svarīgā loma zarnu cilmes šūnu attīstībā. Proti, zarnu cilmes šūnu proliferācija tika stimulēta, saistot laktātu ar receptoru Gpr81 un izraisot Wnt/ β -katenīna signālus Paneta un zarnu stromas šūnām (Lee et al., 2018).

Atšķirībā no probiotikām, **probiotikas+griķu klijas** ievērojami palielināja epitēlija šūnu proliferāciju resnās zarnas *colon* daļā. Griķu klijas ir nozīmīgs šķiedrvielu avots (Taylor & Emmambux, 2008) un kā zināms, šķiedrvielas var mainīt mikrobiotas populāciju un ietekmēt īso ķēžu taukskābes (SCFA) ražošanu cūku modelī. Lai gan galvenie SCFA ražotāji ir rezidējošā obligāti anaerobā mikrobiota, tomēr arī lielākā daļa probiotiku netieši palielina SCFA saturu zarnās. Pienskābās baktērijas resnās zarnas proksimālajā daļā ražo laktātu, kas ir izejviela rezidējošajām SCFA producējošajām baktērijām acetāta, propionāta un butirāta ražošanai (Ushida & Hoshi, 2002; Zhao et al., 2019). Resnajā zarnā absorbētās SCFA ir kā “degviela” gļotādas epitēlija šūnām (Cook & Sellin, 1998). Mūsuprāt, papildus šķiedrvielu iekļaušana cūku barības devā varēja palielināt SCFA resnās zarnas *colon* daļā un sekmēt kolonocītu proliferāciju.

Interesanti, ka visintensīvāko epitēlija šūnu proliferāciju novērojām pēc **augu** piedevas izēdināšanas. Līdz šim pieejamie ziņojumi norāda, ka augu ekstrakti spēj ietekmēt gan šūnu proliferāciju, gan arī diferenciāciju. Ir ziņots, ka mūsu pētījumā iekļautā auga *H. perforatum* polisaharīdi un hiperforīns inducē un stimulē keratinocītu diferenciāciju *in vitro* un *in vivo* (Abakuks & Deters, 2012; Müller et al., 2008). *Astragalus* spp. polisaharīdi stimulē zarnu epitēlija proliferāciju, migrāciju un diferenciāciju (Vega-López et al., 1993). Turklāt augi satur daudz glikozīdu un ogļhidrātu, kas var būt izejviela SCFA ražošanai (Feng et al., 2018), un, kā jau iepriekš minēts, SCFA ir būtiska nozīme fizioloģisko un morfoloģisko parametru uzlabošanā. Piemēram, *Plantago asiatica* L. sēklu polisaharīdi ievērojami palielināja kopējo SCFA saturu, kā arī propionskābes un sviestskābes koncentrāciju žurkām (Nie et al., 2019). Pamatojoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, domājams, ka zarnu epitēlija proliferāciju galvenokārt ietekmēja mikrobiotas metabolisma galaprodukti, fermentējot augu valsts izcelsmes polisaharīdus, taču nevaram izslēgt noteiktu bioaktīvo komponentu tiešu ietekmi uz šūnu proliferāciju, īpaši, kad tiek lietotas papildus augu izcelsmes dzīvnieku barības sastāvdaļas.

4.2.4. Barības komponentu ietekme uz T limfocītu populācijas izmaiņām tievajā un resnajā zarnā

Nozīmīga loma saimniekorganisma aizsardzībā pret patogēniem ir gļotādas imūnsistēmai ko realizē “ar zarnu traktu saistītie limfoīdie audi” (GALT). GALT ir nepārtraukti pakļauti antigēnu iedarbībai un veido būtiskāko daļu no saimnieka imūnsistēmas (Burkey et al., 2009) un tā sevī ietver gan organizētos audus (mezenteriskos limfmezglus, Peijera plates (PP)), gan izkaisītas šūnas pa *lamina propria* un starp epitēlija šūnām, ko pazīst kā intraepitēliālos limfocītus (Mowat & Viney, 1997). Zarnu trakta homeostāzi nodrošina vājas reakcijas stāvoklis pret rezidējošo mikrobiotu un vienlaicīgi aktīva gatavība pret patogēniem, kuras attīstību sekmē mikrobiotas un zarnu epitēlija šūnu mijiedarbība (Maeda et al., 2001). Zarnu epitēlija, dendrītiskās un M šūnas tieši uztver gļotādas mikrobiotas, tās metabolītu antigēnus un inducē

svečveidīgo (*toll-like*) receptoru veidošanos, lai saistītu T un B limfocītus un sekmētu imūnās atbildes reakcijas (Gutzeit et al., 2014). Īpaši uzmanību mēs pievēršam T limfocītu izplatībai, jo tiem ir būtiska nozīme zarnu homeostāzes nodrošināšanā un imūnās atbildes aktivizēšanā pret patogēniem (Van Wijk & Cheroutre, 2010).

Mēs konstatējam, ka **probiotiku** izēdināšana sivēniem palielina T limfocītu izplatību Peijera platēs, *lamina propria* un kā minēts iepriekš, palielināja intraepiteliālo limfocītu skaitu. Jāsaka, ka nenovērojām būtiskas atšķirības starp pētnieciskajām grupām CD3 pozitīvo šūnu sadalījumam tievās zarnas *jejunum* daļas kriptu apvidū, kur visās grupās saglabājās salīdzinoši neliels CD3 pozitīvo šūnu daudzums. Attiecīgi bārktiņu daļā novērojām vidēji daudz, līdz daudz CD3 pozitīvo šūnu skaitu. Lai arī tiek uzskatīts, ka *lamina propria* esošie limfocīti ir lokalizēti difūzi, taču mūsu novērojumi saskan ar Vega-Lopez novērojumiem, ka cūku gļotādā esošajiem limfocītiem ir lielāka organizētības pakāpe, proti-plazmas šūnas koncentrējas kriptu daļā, savukārt T limfocīti – zarnu bārktiņu daļā. Turklāt bārktiņu daļā koncentrējas CD4+ pozitīvās šūnas, kamēr CD8+ šūnas – ap epitēlija šūnu bazālo membrānu (Vega-López et al., 1993). Saimniekorganisma imūnsistēmas attīstībā visbūtiskākā loma ir zarnu mikrobiotai, ko pierāda pētījumi sterilo dzīvnieku modeļos. Steriliem (*germ-free*) dzīvniekiem Peijera plates ir reducētas, tajos ir būtiski samazināts T limfocītu skaits, turklāt novēro būtiski zemāku imūno šūnu skaitu audos (Maeda et al., 2001). Turklāt probiotiku spēju palielināt T limfocītu skaitu Peijera platēs ir ziņojuši arī citi autori (Smelt et al., 2013). Mēs konstatējam, ka probiotikas palielina T limfocītu izplatību ne tikai Peijera plašu interfolikulārajā zonā (T limfocītu zonā), bet arī kupola un folikulārajā (B limfocītu) zonā. Germinatīvajā centrā koncentrējas T līdzētājšūnu (CD4+) subpopulācijas divas unikālās apakškopas: folikulu regulējošie T limfocīti (Tfr) un folikulu līdzētājšūnas (Tfh). Tfh ir svarīga loma germinālo centru veidošanā; sekmē B limfocītu diferenciāciju par plazmas un atmiņas šūnām (Nurieva et al., 2008; Xie & Dent, 2018), savukārt Tfr nomāc pārmērīgu Tfh un B limfocītu proliferāciju germinatīvajā centrā, veicina augstas afinitātes B limfocītu atlasīšanu (Chung et al., 2011; Xie & Dent, 2018). Ir nepieciešami padziļināti pētījumi par Tfh un Tfr sadalījuma attiecību, lai novērtētu probiotiku spēju ietekmēt humorālās imunitātes līdzsvaru. Tomēr citi autori ir ziņojuši, ka probiotikas palielina IgA pozitīvo šūnu skaitu Peijera platēs un *lamina propria* daļā, inducējot IgA ražošanu, kam ir būtiska loma saimniekorganisma gļotādas aizsardzībai pret patogēniem. IgA nomāc baktēriju saistīšanos ar epitēlija šūnām un neitralizē toksīnus (Yahfoufi, et al., 2018).

Pēc nobriešanas Peijera platēs, T limfocīti migrē uz gļotādas pamatkārtu (*lamina propria*) un starp epitēlija šūnām. Kā jau iepriekš minēts, *lamina propria* galvenokārt koncentrējas CD4+ T limfocīti (Vega-López et al., 1993). CD4+ T limfocīti savstarpēji atšķiras ar specifiskiem citokīniem, kas var aktivizēt citas imūnās šūnas, kā rezultātā imūnās atbildes reakcijas var tikt aktivizētas vai nomāktas (Van Wijk & Cheroutre, 2010). Līdzšinējie ziņojumi apstiprina, ka pēc probiotiku ievadīšanas palielinātais T limfocītu skaits *lamina propria* tiek saistīts ar palielinātu regulējošo T limfocītu (Treg) skaitu (Smelt et al., 2013; Suthongsa et al., 2017). Tāpat pētnieki ir ziņojuši, ka probiotikas spēj palielināt IEL skaitu sivēniem tievajās un resnajā zarnā (Rieger et al., 2015). Cūkām vairums IELs pieder pie CD8+ šūnām (Vega-Lopez et al., 2001). Producējot citokīnus, IEL spēj ātri reaģēt uz patogēnu inficētajām vai bojātām šūnām, novēršot patogēnu sistēmisku izplatīšanos (Van Wijk & Cheroutre, 2010). Turklāt, pateicoties spējam ražot keratinocītu augšanas faktoru (KGF), tiem ir būtiska loma epitēlija integritātes uzturēšanā, nodrošinot epitēlija šūnu augšanas faktora lokalizētu piegādi un iesaistoties bojātā epitēlija virsmas saglabāšanā (Dahan et al., 2007). Pelēm ar samazinātu IEL skaitu tika novērots palielināts baktēriju skaits mezenterālajos limfmezglos (Ismail et al., 2009). Mūsu pētījumā probiotiku iekļaušana sivēnu barībā ietekmēja zarnu gļotādas imūnsistēmu gan indukcijas (limfoīdajos folikulos-Peijera platēs), gan efektora vietās (limfocīti *lamina propria* un zarnu gļotādas IEL), tādējādi norādot uz aktīvu imūnmodulējošu efektu.

Probiotiku un griķu kliju kombinācijas iedarbību galvenokārt novērojām resnajā zarnā, palielinot T limfocītu skaitu *lamina propria* un IEL grupā. Ņemot vērā, ka griķu klijas ir šķiedrvielas avots, tās nesagremotas nonāk resnajā zarnā, kur zarnu mikrobiota tās fermentē

līdz butirātam, t.i., sākotnēji kondensētas no 2acetil-CoA molekulām līdz acetoacetyl-CoA un tālāk reducētas līdz butiril-CoA. Tad šī molekula tiek pārveidota par butirātu, izmantojot fosfāta transbutiralāzes/butirātu kināzes ceļu (Koh et al., 2016). Butirāts var netieši ietekmēt imūnās šūnas, proti, caur mikrobiotas modulāciju, kā arī tieši iedarboties uz imūnajām šūnām zarnu gļotādā, palielinot regulējošo T limfocītu skaitu un samazinot efektoro T limfocītu aktivitāti, tādējādi veicinot iedzimto imūno toleranci (Gonçalves et al., 2018; Wu et al., 2017). Interesanti, ka probiotiku+griķu kliju kombinācija nepalielināja IEL skaitu tievās zarnas *jejunum* daļā, kas varētu liecināt par griķu kliju inhibējošo iedarbību uz iekļautajām probiotikām.

Mēs novērojām, ka **augu piedeva** samazināja IEL skaitu *jejunum*, taču palielināja T limfocītu skaitu gan interfolikulārajā zonā, gan Peijera platēs, savukārt neviennozīmīgs iedarbības efekts tika novērots uz T limfocītu blīvumu gļotādas *lamina propria* daļā. Ja tievās zarnas (*jejunum*) gļotādas *lamina propria* daļā augu piedevai novērojām tendenci samazināt T limfocītu relatīvo daudzumu, tad resnās zarnas *colon* daļā – būtiski palielināt. Arī citos ziņojumos ir norādīta augu polisaharīdu spēja stimulēt imūnkompetentās šūnas Peijera platēs (Georgiev et al., 2017), tādējādi norādot uz imūnsistēmas kopumā stimulējošo darbību.

Augi satur lielu skaitu molekulu, kas spēj regulēt imūno šūnu aktivitāti; turklāt, atkarībā no apstākļiem, vienam un tam pašam augam var būt gan stimulējoša, gan inhibējoša iedarbība. Augu ūdens ekstrakti satur vairāk hidrofilus komponentus, piemēram, polisaharīdus, kas var aktivizēt imūnsistēmas reakcijas. Taču augu etanola un metanola ekstrakti vairāk satur hidrofobos savienojumus, piemēram, flavonoīdus, terpenoīdus, kuriem parasti piemīt spēja nomākt imūno šūnu atbildes reakcijas (Martel et al., 2017), piemēram, ēterisko eļļu saturošs ekstrakts samazināja IEL skaitu tievās zarnas *jejunum* daļā agrā periodā atšķirtiņiem sivēniem (Manzanilla et al., 2006). No vienas puses, ārstnieciskajiem augiem piemīt antibakteriālas īpašības (Field et al., 2017); modulējot vai samazinot baktēriju slodzi, tiek samazināta arī svečveidīgo (*toll-like*) receptoru aktivācija, kam varētu sekot T šūnu proliferācijas samazināšanās (Smith & Garrett, 2011). Taču no otras puses, vairumam no augiem piemīt arī spēcīga pretiekaisuma iedarbība (Saddiqe et al., 2010). Augu bioaktīvās sastāvdaļas var samazināt prostaglandīnu (iekaisuma mediatoru) biosintēzi, pateicoties to ciklooksigenāzes inhibējošai aktivitātei. Svarīgi, ka samazināta iekaisuma reakcija samazina T limfocītu migrāciju uz bārkstiņu epitēliju (Michiels et al., 2010). Jāuzsver, ka mūsu pētījumā izmantotās augu piedevas sastāvā esošie augi *P. major* un *H. perforatum* raksturojas ar spēcīgu ciklooksigenāzes inhibējošu aktivitāti. Savukārt T limfocītu pieaugums resnās zarnas *colon* daļā, kā arī IEL skaita palielināšanos varēja ietekmēt potenciālais SCFA pieaugums, pateicoties augos esošo polisaharīdu prebiotiskajām īpašībām (Yahfoufi, et al., 2018). SCFA ietekmē T limfocītu populāciju no vairākiem aspektiem – tiešā veidā uzlabojot T limfocītu (Th1 un Th17) ģenerāciju, tādējādi palielinot spēju cīnīties pret patogēniem un, ietekmējot arī T limfocītu spēju ražot IL-10, kas ir svarīgs priekšnoteikums, lai novērstu iekaisuma reakcijas (C. H. Kim et al., 2014). Ņemot vērā, ka $\delta\gamma$ IEL spēj ražot citokīnus IL-1 β un TGF β , kas savukārt izraisa pretiekaisuma un antimikrobiālo CD4 pozitīvo limfocītu apakškopu izplatīšanos *lamina propria*, tāpēc, kā skaidro pētnieki (Smith & Garrett, 2011), nevaram izslēgt IEL inducēto T limfocītu izplatības pieaugumu *lamina propria* daļā darbību.

4.2.5. Barības komponentu ietekme uz taukskābju saturu muskuļaudos

Taukskābju sastāvs ir cieši saistīts ar gaļas uzturvērtību, taču dzīvnieku, īpaši cūku intramuskulārie taukaudi raksturojas ar augstu piesātināto taukskābju saturu. Piesātinātās taukskābes, īpaši kas satur 12-16 oglekļa atomus, būtiski ietekmē zema blīvuma lipoproteīna koncentrāciju asinīs un ir riska faktors kardiovaskulārajām slimībām (CVD), turpretī, nepiesātinātās taukskābes ir labvēlīgas cilvēka veselībai – uzlabo vielmaiņu, samazina CVD risku, kā papildterapiju izmanto neiroloģisko traucējumu ārstēšanā un mazina iekaisuma

simptomātiku (Shramko et al., 2020). Turklāt jāuzsver, ka cūkgaļa parasti nodrošina nepieciešamo omega-6, taču trūkst omega-3 polinepiesātināto taukskābju.

Analizējot taukskābju saturu *m. Longissimus thoracis et lumborum* muskuļaudos, konstatējām taukskābju satura izmaiņas, iekļaujot barības devā probiotikas. Tās būtiski palielināja α -linolēnskābes (C18:3, ω -3) un palmitoleīnskābes (C16:1, ω -7) daudzumu, savukārt samazināja stearīnskābes (C18:0) saturu starpmuskuļaudu taukaudos, salīdzinot ar kontroles grupu. Līdzīgi kā mūsu pētījumā, arī citi autori ir ziņojuši par labvēlīgu probiotiku ietekmi uz muskuļaudu taukskābju profilu, samazinot piesātināto un palielinot mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju daudzumu muskuļaudos (Ross et al., 2012). Kādā citā pētījumā probiotikas palielināja polinepiesātināto (ω -3 un ω -6) taukskābju saturu cūkgaļā, taču samazināja mononepiesātināto taukskābju (MUFA) saturu (Chang et al., 2018).

Pēdējos gados interese par drošas un dabiskas izcelsmes barības izēdināšanu dzīvniekiem arvien pieaug, īpaši par augu izcelsmes piedevām. Zināms, ka augos esošās fenolskābes, fenoliskie terpēni, flavonoīdi un ēteriskās eļļas darbojas kā antioksidanti, taču svarīgi bija noskaidrot šīs grupas piedevu iespējamo ietekmi uz taukskābju saturu. Pētījumā, izēdinot augu piedevu (H un PB grupas), sivēnu muskuļaudos mēs konstatējām augstāku tikai linolēnskābes (C18:3, ω -3) procentuālo īpatsvaru, salīdzinot ar kontroles grupu, tādēļ varam secināt, ka augu piedevas neizraisa negatīvu ietekmi uz muskuļaudu taukskābju profilu.

Saskaņā ar Apvienotās Karalistes Veselības ministrijas rekomendācijām, taukskābju profila veselīguma pamatrādītājam – polinepiesātināto un piesātināto taukskābju attiecībai (PUFA:SFA) ir jābūt virs 0.4 (Department of Health, 1994). Saskaņā ar mūsu rezultātiem, probiotiku iekļaušana sivēnu barības devā nodrošināja rekomendējamo polinepiesātināto un piesātināto taukskābju attiecību cūkgaļā, tādējādi probiotiku iekļaušana barības devā var būt vēlama, lai ne tikai uzlabotu gremošanas trakta mikrobiotu, bet arī modificētu un uzlabotu cūkgaļas taukskābju profilu.

4.3. Ēterisko eļļu antibakteriālā darbība un to piedevu (kaprīliskābes, NaCl) ietekme uz ēterisko eļļu efektivitāti pret ESBP producējošajiem *E. coli*

Viens no potenciālajiem avotiem rezistentu baktēriju izplatības ierobežošanā (kā alternatīva antibiotikām) ir ēteriskās eļļas (EO). Tās, salīdzinot ar antibiotikām, ir ne tikai dabiskas, bet uzskata arī par mazāk toksiskām un bez atliekvielām (Gong et al., 2014). Savukārt ēterisko eļļu sinerģisms ar citām dabiskas izcelsmes vielām ļauj samazināt nepieciešamo ēterisko eļļu patēriņu un vienlaikus sekmē efektīvāku cīņu ar rezistentu baktēriju celmiem (Omonijo et al., 2018). Mūsuprāt, izvērtējot bagātināto ēterisko eļļu darbības efektivitāti pret rezistentiem *E. coli*, kas izolēti no cūku fekālijām, sekmētu arī šo EO izmantošanu rezistentu baktēriju kontrolē cūkkopības saimniecībās.

4.3.1. Latvijas un komerciālo ēterisko eļļu ķīmiskā sastāva raksturojums

Lamiaceae dzimtas augi tradicionālajā medicīnā ir izmantoti gadsimtiem ilgi, taču arī mūsdienu medicīnā, veterinārmedicīnā un pārtikas rūpniecībā tiem aizvien vairāk tiek pievērsta uzmanība. Pierādīts, ka kopumā ēteriskajām eļļām (EO), kas ir gaistošo savienojumu maisījumi, piemīt spēcīga antimikrobiāla, antioksidatīva un pretiekaisuma darbība (Nieto, 2017). Analizējot katras darbā izmantotās ēteriskās eļļas sastāvu, īpaši pievēršām uzmanību aromātisko monoterpenoīdu (timola, karvakrola) koncentrācijai, jo tie raksturojas ar spēcīgu antibakteriālo darbību (Guimarães et al., 2019).

Katru ēterisko eļļu, atkarībā no tās sastāvā dominējošā komponenta, cenšas klasificēt tā sauktajos ķīmijtipos. Piemēram, *T. serpyllum* (mazais mārsils) ēteriskā eļļa bieži tiek klasificēta kā timola ķīmijtips augstās timola koncentrācijas dēļ (Kovačević et al., 2021; Nikolić et al., 2014). Pētnieki no Serbijas, analizējot dienviņu platuma grādos augušas *T. serpyllum* ēteriskās

eļļas sastāvu, norādīja sekojošu gaistošo savienojumu procentuālo sadalījumu: timols (38.5%), *p*-cimēns (8.9%) un γ -terpinēns (7.2%) (Nikolić et al., 2014). Līdzīgus novērojumus ir ziņojusi cita pētnieku grupa, izceļot timolu (54.17%), γ -terpinēnu (22.18%) un *p*-cimēnu (16.66%) kā galvenās sastāvdaļas *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā (Kovačević et al., 2021). Tomēr, pamatojoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, galvenais **komerciālās *T. serpyllum*** ēteriskās eļļas gaistošais aromātiskais pārstāvis bija **karvakrols** (53.34%), bet timols – tikai 1%. Jāatzīst, ka bieži *T. serpyllum* ēterisko eļļu pētnieki klasificē kā jaukta (timola-karvakrola) ķīmijtipa variantu. Piemēram, ēteriskajā eļļā, kas iegūta Slovākijā, timola un karvakrola koncentrācija bija attiecīgi 18.8% un 17.4% (Galovičová, Borotová, Valková, Vukovic, Vukic, Terentjeva, et al., 2021), taču mūsu novērotais karvakrola ķīmijtips *T. serpyllum* EO līdz šim ir ziņots reti (Wesolowska et al., 2015).

Salīdzinot komerciālās un Latvijas *T. serpyllum* ēteriskās eļļas timola un karvakrola koncentrāciju, redzam, ka Latvijas EO saturēja augstāku timola (3.74%), taču būtiski zemāku – karvakrola (7.70%) koncentrāciju, salīdzinot ar komerciālo *T. serpyllum* EO, kur timola un karvakrola koncentrācija bija attiecīgi 1% un 53.34%. Tomēr jāuzsver, ka mūsu pētījumā konstatētais aromātisko fenolu daudzums Latvijas *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā bija ievērojami lielāks nekā ziņoja Lietuvas kolēģi, kur karvakrola un timola koncentrācija *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā bija attiecīgi 2.0% un 2.3% (Ložionė & Venskutonis, 2006). Līdzīgus novērojumus ziņoja pētnieku grupa no Igaunijas, norādot, ka *T. serpyllum* EO karvakrola un timola koncentrācija nepārsniedza attiecīgi 3.5% un 2.9% (Raal et al., 2004). Interesanti, ka mūsu pētījuma rezultāti saskan ar Pāvera un līdzautoru sniegto ziņojumu (Paaver et al., 2008), kur minēts līdzvērtīgs karvakrola (11.5%) un timola (3.0%) procentuālais daudzums *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā, kuras izcelsme arī bija Latvija.

Lai arī mūsu pētījumā **Latvijas *T. serpyllum*** ēteriskā eļļa saturēja salīdzinoši augstākā koncentrācijā aromātiskos monoterpenoīdus nekā Lietuvas un Igaunijas izcelsmes mazā mērsila EO, tomēr tā atbilst **γ -terpinēna** (21.93%) ķīmijtipam.

Mēs konstatējām augstu timola procentuālo koncentrāciju Latvijas (27.59%) un komerciālajā (26.66%) *T. vulgaris* (parastais timiāns) ēteriskajā eļļā, turklāt bez būtiskām daudzuma atšķirībām. Taču kopumā **Latvijas *T. vulgaris*** EO tika klasificēta kā **timola** (27.59%), bet **komerciālā *T. vulgaris*** EO – kā ***p*-cimēna** (35.4%) ķīmijtips. Būtiskas timola procentuālās koncentrācijas atšķirības novērojām starp ēteriskajām eļļām, kas iegūtas no *S. montana*: komerciālajā EO tā saturs bija 17.10%, kamēr Latvijas izcelsmes – tikai 1.41%. Savukārt viszemākā timola koncentrācija bija *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā, kur tā koncentrācija komerciālajā un Latvijas EO bija attiecīgi 3.74% un 1.00%.

p-cimēns bija otrs izplatītākais gaistošo vielu pārstāvis, kura relatīvo pieejamību apstiprināja GC-MS masspektrometrija. Visaugstāko *p*-cimēna saturu konstatējām komerciālajā *T. vulgaris* ēteriskajā eļļā, bet tā koncentrācijas būtiski atšķīrās starp komerciālo (35.4%) un Latvijas (23.63%) EO. Līdzīgi kā tas bija ar timola koncentrāciju, arī *p*-cimēna koncentrācija viszemākā bija *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā, taču bez būtiskām atšķirībām starp grupām. Kā sekojošie būtiskākie komponenti Latvijas izcelsmes EO ir γ -terpinēns, taču komerciālās izcelsmes EO – β -linalols. Jāuzsver, ka *T. vulgaris* ēteriskajā eļļā *p*-cimēns, γ -terpinēns un β -linalols kā gaistošo vielu pārstāvji vienlīdz bieži tiek novēroti mainīgos procentuālajos daudzumos (Galambosi et al., 2010; Galovičová, Borotová, Valková, Vukovic, Vukic, Štefániková, et al., 2021; Kovačević et al., 2021; Nikolić et al., 2014).

Timola izomērs – karvakrols – bagātīgā daudzumā bija konstatēts **komerciālajā** (26.37%) un **Latvijas** (35.54%) *S. montana* (kalnu pupumētra) ēteriskajā eļļā, turklāt **abas** ēteriskās eļļas tika klasificētas kā **karvakrola ķīmijtipi**; Kā minējam iepriekš, arī komerciālā *T. serpyllum* EO saturēja ļoti augstu karvakrola daudzumu (53.34%). Mūsu novērojumi – *S. montana* kā tipisks karvakrola ķīmijtips, saskan ar citu autoru sniegtajiem ziņojumiem, taču tā procentuālā svārstība ēteriskās eļļas sastāvā ir augsta – 13.7-76.6%, un tas varot būt atkarīgs no augu izcelsmes (Navarro-Rocha et al., 2020; Šojić et al., 2019; Vitanza et al., 2019). Retāk

ziņoti ir citi *S. montana* ķīmijtipi – *p*-cimēna-linalola (Slavkovska et al., 2001) un β -kariofilēna-germakrēna D (Ibraliu et al., 2010).

Kopumā laboratorijas apstākļos iegūtajās (Latvijas) ēteriskajās eļļās novērojām zemāku timola un karvakrola summāro koncentrāciju. Ložiene un Venskutonis ir ziņojuši (Ložionē & Venskutonis, 2006), ka ziemeļu klimats negatīvi ietekmē gaistošo fenola savienojumu sintēzi, kas no vienas puses varētu izskaidrot timola un karvakrola zemāku koncentrāciju arī mūsu iegūtajās ēteriskajās eļļās. Taču no otras puses, mēs nenovērojām būtiskas atšķirības starp kopējo aromātisko gaistošo vielu daudzumu Latvijas un komerciālajā *T. vulgaris* ēteriskajā eļļā. Kā minējām iepriekš, salīdzinoši lielu daudzumu karvakrola daudzumu atklājām Latvijas *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā. Turklāt kādā pētījumā salīdzinoši augsta timola koncentrācija (75.8-80.5%) tika novērota ēteriskajā eļļā, kas iegūta no Somijas ziemeļos audzētā *T. vulgaris* augu daļām (Galovičová, Borotová, Valková, Vukovic, Vukic, Terentjeva, et al., 2021). Piedevām, vienā no Eiropas dienvidvalstīm – Albānijā tika ziņots par ievērojamām gaistošo aromātisko savienojumu koncentrācijas svārstībām *S. montana* ēteriskajā eļļā (Ibraliu et al., 2010). Tāpēc, domājams, ka augu ģenētika, nevis klimats, galvenokārt varētu ietekmēt aromātisko gaistošo savienojumu sintēzi augos, kas rezultātā nosaka gaistošo vielu sastāvu un saturu ēteriskajā eļļā.

4.3.2. Komerciālo un Latvijā augušu augu ēterisko eļļu antibakteriālās darbības salīdzinājums pret *E. coli*

Salīdzinot Latvijas izcelsmes ēteriskās eļļas ar komerciālajām, novērojām samazinātu antibakteriālo aktivitāti, kas, visdrīzāk, skaidrojams ar skābekli nesaturošu ogļūdeņražu pārpilnību šajās ēteriskajās eļļās. Citi pētnieki ir ziņojuši, ka, piemēram, γ -terpinēnu varētu uzskatīt kā vājas antibakteriālās aktivitātes indikatoru (Guimarães et al., 2019). Viens no skaidrojumiem zemākai antibakteriālajai aktivitātei varētu būt, ka skābekli nesaturošie monoterpēni samazina skābekli saturošo terpēnu šķīdību ūdenī, kā rezultātā radot antagonisku darbības efektu pret skābekli saturošiem monoterpēnu ogļūdeņražiem (Cox et al., 2001). Savukārt *p*-cimēna salīdzinoši augstā koncentrācija komerciālajās eļļās lielā mērā ir veicinājusi pastiprinātu antibakteriālo aktivitāti pret *E. coli*. *p*-cimēna un karvakrola sinerģiskais efekts ir apstiprināts arī citos pētījumos (Ultee et al., 2002). *p*-cimēns un tā hidrofobās īpašības veicina karvakrola penetrāciju caur baktēriju šūnas membrānu, sekmējot baktērijas šūnas membrānas destabilizāciju un karvakrola inhibējošo aktivitāti (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Ultee et al., 2002). *p*-cimēna īpašību – uzlabot vielu penetrāciju, ir apstiprinājuši citi autori (Kang et al., 2007), uzsverot, ka šīs molekulas ir kā veicinātāji transdermālo zāļu formās, kas atvieglo zāļu aktīvo vielu penetrāciju cauri cilvēka ādai.

Neskatoties uz to, ka pētījumā izmantoto Latvijas un komerciālās *T. vulgaris* ēteriskās eļļas uzrādīja līdzvērtīgu aromātisko, skābekli saturošo un skābekli nesaturošo monoterpēnu daudzumu, tomēr pārbaudīto ēterisko eļļu antibakteriālā aktivitāte būtiski atšķīrās. Šis novērojums atklāj skaitliski mazākumā esošu atsevišķu molekulu spēju būtiski ietekmēt ēterisko eļļu antibakteriālo darbību. Komerciālā *T. vulgaris* ēteriskā eļļa saturēja lielāku limonēna un β -linalola procentuālo daudzumu. Limonēns ir viens no nedaudziem skābekli nesaturošajiem monoterpēniem, kam ir ievērojama antibakteriālā darbība (0.25mg mL^{-1}) pret vairākām baktērijām, t.sk., *E. coli* (Guimarães et al., 2019). Savukārt β -linalols ir skābekli saturošs monoterpēns, kam ir pierādīta efektīva iedarbība gan pret Gram pozitīvajām, gan pret Gram negatīvajām baktērijām (Cosentino et al., 1999; Guimarães et al., 2019). Pēc mūsu domām, komerciālās *T. vulgaris* ēteriskās eļļas augstāka antibakteriālā darbība varētu būt saistīta ar timola un β -linalola un/vai limonēna sinerģiju, kā tas bija novērojams karvakrola un *p*-cimēna savstarpējās mijiedarbības gadījumā.

Pārsteidzoši, ka, neskatoties uz karvakrola ļoti augsto procentuālo koncentrāciju komerciālajā *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā (53.34% , 2334mg kg^{-1}), tomēr antibakteriālā

aktivitāte bija ievērojami zemāka nekā gaidīts. Šo fenomenu novēroja arī Vesolovska ar līdzautoriem (Wesolowska et al., 2015), ierosinot, ka tas varētu būt ēteriskajā eļļā esošo atsevišķu savienojumu antagoniskas mijiedarbības rezultāts. Piemēram, Gallucci ar līdzautoriem ir ziņojis, ka karvakrols un β -mircēns mijiedarbojoties izraisa antagonisku efektu uz antibakteriālo darbību pret *E. coli* un Gram pozitīvajām baktērijām (Gallucci et al., 2009). Turklāt jāuzsver, ka vislielāko β -mircēna daudzumu konstatējām tieši komerciālajā *T. serpyllum* ēteriskajā eļļā.

4.3.3. Kaprīlskābes un NaCl piedevu ietekme uz ēterisko eļļu antibakteriālo darbību pret *E. coli*

Kaprīlskābe ir piesātināto taukskābju pārstāvis, kuras antibakteriālo aktivitāti varētu raksturot ar kopumā taukskābju spēju mijiedarboties ar baktēriju šūnas membrānām (Yoon et al., 2018), jo mūsu pētījuma rezultāti saskan ar citu pētnieku rezultātiem, pierādot, ka pastāv sinerģiska mijiedarbība starp ēteriskajām eļļām/fenoliem un vidējo ķēžu taukskābēm (MCFA), tādējādi ir iespējams vēlamās antibakteriālās darbības nodrošināšanai izmantot zemāku citas aktīvās vielas daudzumu (Hulánková & Bořilová, 2011; S. A. Kim & Rhee, 2016; Rani et al., 2022). Taukskābju īpašības veicina tā saukto lipīdu micellu agregātu veidošanos, kad, taukskābju lipofilajai daļai, mijiedarbojoties ar baktēriju membrānas fosfolipīdiem, rezultātā tiek izjaukta šūnas membrānas integritāte (Casillas-Vargas et al., 2021; Desbois & Smith, 2010). Turklāt taukskābēm kopumā piemīt arī spēja izjaukt elektronu pārnese reakcijas, saistoties ar elektronu nesējiem un izraisot traucējumus oksidatīvās fosforilācijas procesos, tādējādi tiek ietekmēta šūnas enerģijas ražošana (Desbois & Smith, 2010; Yoon et al., 2018).

Vairāki pētnieki ir ziņojuši, ka vidējo taukskābju inhibīcijas aktivitāte uzlabojas pat būtiski zemākās koncentrācijās, pievienojot augu izcelsmes ēteriskās eļļas (Hulánková & Bořilová, 2011; S. A. Kim & Rhee, 2016; Rani et al., 2022). Kas attiecas uz Gram negatīvajām baktērijām, tad visizteiktākās izmaiņas baktēriju membrānā ir novērotas, lietojot karvakrola un kaprīlskābes maisījumu (Rani et al., 2022). Rezultātā, izraisītā baktēriju membrānu palielinātā caurlaidība (Rani et al., 2022) veicina ūdeņraža jonu iekļūšanu šūnā, rezultātā taukskābes uzrāda baktericīdu iedarbību (S. A. Kim & Rhee, 2016).

Lai arī ēterisko eļļu un kaprīlskābes sinerģiskā darbība kopumā ļauj veiksmīgi inhibēt *E. coli*, izmantojot dabīgus augu izcelsmes savienojumus, tomēr mūsu pētījumā izmantotā kombinācija – ***T. serpyllum* ēteriskā eļļa + kaprīlskābe**, nepierādīja būtisku antimikrobiālās darbības ietekmi. Taču, *T. serpyllum* ēteriskās eļļas bagātināšana ar kaprīlskābi ļāva samazināt mums ēteriskās eļļas daudzumu par 29%, vienlaikus nezaudējot antibakteriālo aktivitāti. Šīs kombinācijas sinerģiskuma trūkumu varētu skaidrot ar *T. serpyllum* ēteriskās eļļas zemāku antibakteriālo darbību un iespējamo savstarpējo komponentu mijiedarbību šajā EO.

Pierādīts, ka augsts ārējais osmotiskais spiediens, ko rada hipertonska vide, veicina ūdens izplūdi no baktērijām un dehidratācijas attīstību (Wood, 2015), taču, mūsu pētījuma rezultāti apliecina, ka *E. coli* spēj veiksmīgi izdzīvot un pat augt paaugstinātas osmolaritātes vidē (3% NaCl). Tomēr, pievienojot ēteriskajām eļļām šo **3% NaCl piedevu**, novērojām efektīvāku antibakteriālo iedarbību pret *E. coli*. Arī Kims ar līdzautoriem ir pētījis 3-15% NaCl šķīduma ietekmi uz baktērijām, novērojot baktēriju šūnu membrānas bojājumu pakāpi. Nozīmīgi, ka, lai arī šūnu membrānas bojājuma pakāpe korelē ar NaCl šķīduma pieaugošo koncentrāciju; tomēr radītie bojājumi var būt atgriezeniski, ja baktērijas tiek kultivētas barojošā vidē (N. H. Kim et al., 2020). Analizējot lielākas (5-10%) NaCl šķīduma koncentrācijas ietekmi uz *E. coli* O157:H7, pētnieki konstatēja, ka *E. coli* spēj saglabāt savas šūnas struktūras integritāti un pat vairoties pēc 12h inkubācijas hipertonskā vidē, taču 24 h ilga ietekme izraisa vizualizējamās morfoloģiskas *E. coli* šūnas izmaiņas (Hajmeer et al., 2006).

Kā atbildes reakcija uz hiperosmotisko šoku seko neorganisko jonu (bieži K^+) uzkrāšanās baktēriju šūnās (Sleator & Hill, 2002), taču, ja šīs reakcijas “robežpunkts” tiek pārsniegts, kas

ir aptuveni 0.5 M NaCl (mūsu pētījumā tika izmantots 0.52 M NaCl šķīdums), seko tālākā reakcija, kad baktērijas aktivizē aktīvo osmoprotektoru sintēzi (Sleator & Hill, 2002; Wood, 2015). Tā kā šāds osmotiskais šoks izraisa ūdens plūsmu baktēriju šūnā (Wood, 2015), tad, pēc mūsu domām, baktēriju šūnā esošās enerģijas novirzīšana uz osmoregulācijas sistēmām ir veicinājusi ēterisko eļļu iedarbību hipertoniskā vidē. EO iedarbības principu raksturo arī, ka kopumā aromātisko monoterpenoīdu hidrofobitāte veicina to uzkrāšanos baktērijas citoplazmātiskās membrānas fosfolipīdu dubultslānī, kā rezultātā palielina tās caurlaidību (Ben Arfa et al., 2006). Savukārt aromātisko monoterpenoīdu molekulā esošā brīvā hidroksilgrupa ietekmē jonu apmaiņas reakcijas, samazinot baktērijām vitāli svarīgā adenozintrifosfāta (ATF) sintēzi un, izsīkstot šīm enerģijas rezervēm, tiek ierosināta baktēriju šūnas nāve (Ben Arfa et al., 2006; Ultee et al., 2002). Tā kā mēs pētījumā izmantojām konstantu NaCl koncentrācijas šķīduma piedevu, tad mums nebija iespējams aprēķināt frakcionētās inhibējošās koncentrācijas indeksu (FICI), lai apstiprinātu sinerģismu starp pētījumā izmantotajām ēteriskajām eļļām un NaCl šķīdumu. Taču mūsu pētījuma rezultāti saskan ar citu autoru iegūtajiem rezultātiem, ka NaCl pievienošana būtiski samazina nepieciešamo ēterisko eļļu koncentrāciju, kas nepieciešama, lai sasniegtu pietiekamu antibakteriālo aktivitāti – samazinot ēteriskās eļļas minimālo inhibējošo vai minimālo baktericīdo koncentrāciju (N. H. Kim et al., 2020).

Pētījuma rezultātā mēs novērojām lielāku sinerģisma potenciālu ēteriskajām eļļām, kas saturēja augstāku timola līmeni, taču, lai apstiprinātu šo novērojumu, ir nepieciešami padziļināti pētījumi ar lielāku baktēriju izolātu skaitu.

Lai arī citi pētnieki ir ziņojuši, ka NaCl piedeva bija vienlīdz efektīva abiem aromātisko fenolu pārstāvjiem (gan timolam, gan karvakrolam) (N. H. Kim et al., 2020), tomēr iepriekš pieminētajā pētījumā tika izmantoti tīri fenolu pārstāvji, taču mūsu pētījumā izmantotās ēteriskās eļļas saturēja arī virkni citus komponentus. Uzrādīto antibakteriālo darbību, iespējams, nodrošināja eļļās esošo sastāvdaļu savstarpējā mijiedarbība.

4.3.4. Ēterisko eļļu un bagātināto ēterisko eļļu antibakteriālās aktivitātes salīdzinājums pret ESBL producējošiem/ne-producējošiem *E. coli*

Ir bijuši daudzi ziņojumi, kas apstiprina ēterisko eļļu augsto efektivitāti pret ESBL producējošiem un/vai multirezistentajiem patogēnajiem *E. coli* (Benameur et al., 2019; Kovačević et al., 2021; Rani et al., 2022), taču joprojām trūkst informācijas par dažāda līmeņa rezistentu (ESBL/ne-ESBL, MDR/ne-MDR) *E. coli* jutību pret vienu un to pašu ēterisko eļļu.

Mūsu pētījuma rezultāti atklāj, ka tīrām ēteriskajām eļļām (izņemot *T. vulgaris*) ir augstākas MIC vērtības pret ESBL producējošiem *E. coli* salīdzinot ar ESBL ne-producējošiem *E. coli* (antibiotiku jutīgiem celmiem). Savukārt, ja salīdzina tīru ēterisko eļļu efektivitāti pret MDR un ne-MDR *E. coli*, konstatējām, ka tikai *S. montana* ēteriskai eļļai bija ievērojami augstākas MIC vērtības pret MDR *E. coli*.

Benameurs ar līdzautoriem ir ziņojis, ka *T. vulgaris* ēteriskās eļļas efektivitāte pret MDR ESBL producējošo *E. coli* ir atkarīga no sastāvā esošajiem bēta-laktamāzes kodējošajiem gēniem, proti, CTX-M-1 producējošie *E. coli* ir jutīgāki nekā SHV producējošie (Benameur et al., 2019). Tomēr, pēc mūsu domām, uz šo apgalvojumu jāattiecas piesardzīgi, jo abi celmi ir klasificēti kā MDR, tāpēc jāņem vērā arī citu gēnu iespējamā ietekme. ESBL producējošo *E. coli* rezistence ir saistīta ne tikai ar hidrolizējošo bēta-laktamāžu klātbūtni, bet arī ārējās membrānas samazināto caurlaidību porīnu zuduma vai modifikācijas dēļ (Khalifa et al., 2021; Pagès et al., 2008). Turklāt izplūdes sūkņi (eflukss) ir izplatīts MDR baktēriju rezistences mehānisms, kam arī piemīt fizioloģiskas funkcijas, īpaši stresa apstākļos, reaģējot uz vides un fizioloģiskajiem signāliem (Sun et al., 2014). Mūsaprāt, membrānas caurlaidības samazināšanās ESBL producējošajiem *E. coli* un izplūdes sūkņa (eflukss) klātbūtne MDR *E. coli* varētu būt galvenie iemesli, kas izraisa dažu ēterisko eļļu zemāku aktivitāti pret attiecīgajiem *E. coli*.

Baktēriju spējai attīstīt rezistenci pret ēteriskajām eļļām joprojām ir pretrunīgi skaidrojumi. Ir aprakstīta *Salmonella enterica* serovar. Senftenbergs spēja adaptēties baziliku saturošā vidē un attīstīt pat rezistenci pret bazilika eļļu un tās galvenajiem komponentiem, t.i., linalolu, estragolu un eugenolu (Kisluk et al., 2013). Pierādīts, ka ilgstoša linalola iedarbība uz baktērijām palielina to MIC vērtības, kā arī veicina krustenisko rezistenci pret vairākām antibiotikām, taču tai pašā laikā šiem rezistentajiem pārstāvjiem var būt problemātiski izdzīvot apkārtējā vidē (Kalily et al., 2017). Tomēr jāuzsver, ka iepriekšminētie secinājumi par ēterisko eļļu lomu rezistentu baktēriju attīstībā ir balstīti uz kādu atsevišķu (vienu noteiktu) ēteriskās eļļas komponenta ietekmi. Vairums autoru tomēr atzīst, ka baktērijas reti spēj attīstīt rezistenci pret ēterisko eļļu, kas satur lielu skaitu aktīvo savienojumu, kuriem, savukārt, baktēriju šūnā ir vairāki darbības virzieni (Becerril et al., 2012; Hammer et al., 2012).

Mūsu pētījumā ar kaprilskābi vai NaCl piedevu bagātinātās ēteriskās eļļas bija vienlīdz efektīvas pret ESBL un ne-ESBL, kā arī MDR un ne-MDR *E. coli*. Turklāt konstatējām, ka ar NaCl bagātinātā *T. vulgaris* ēteriskā eļļa ir efektīvāka pret *E. coli* ar augstāku rezistences līmeni nekā pret antibiotiku jutīgiem celmiem vai celmiem ar zemāku rezistences līmeni. Tas liecina, ka ar NaCl bagātinātās ēteriskās eļļas spēj iedarboties uz baktēriju šūnu vispusīgāk un tas savukārt varētu būt sekmīgāks risinājums, lai apietu baktēriju rezistences mehānismus. Sālā vide, ko nodrošina NaCl pievienošana ēteriskajai eļļai, ir efektīva, jo tā izraisa morfoloģiskas izmaiņas baktēriju membrānā un padara bioaktīvajiem komponentiem baktēriju virsmu amorfāku un caurlaidīgāku. Citi autori ir novērojuši arī citus labvēlīgus NaCl saturošu šķīdumu efektus, piemēram, ka samazina biomembrānu veidošanos un baktēriju kustīgumu (F. Li et al., 2021), savukārt sāls šķīduma radītais abiotiskais stress varētu veicināt plazmīdu elimināciju un inhibīciju horizontālajā plazmīdu pārnēsē (L. Tan et al., 2019).

SECINĀJUMI

1. Cūkkopības saimniecībās komensiālajam *E. coli* ir ļoti augsts rezistences līmenis pret tetraciklīnu (54.63%), augsts – pret ampicilīnu (32.03%), trimetoprimu (24.07%), sulfametoksazolu-trimetoprimu (22.44%) un amoksicilīnu-klavulānskābi (22.28), bet zems – pret fluorohinaloniem (enrofloksacīnu (8.78%), ciprofloksacīnu (3.58%)), gentamicīnu (5.69%), cefazolīnu (4.55%) un trešās paaudzes cefalosporīniem (cefotaksīmu (1.46%)). Antibiotiku rezistentos *E. coli* biežāk izolējām lielajās saimniecībās un cūkām no 4 līdz 12 nedēļu vecumam, kas norāda uz plašāku dažādāka spektra antibiotiku lietojumu lielajās saimniecībās un attiecīgajā cūku audzēšanas posmā.
2. Ar selektīvi diferenciālo metodi konstatējām salīdzinoši augstu (23.4%) ESBL producējošā *E. coli* izplatību cūkkopības saimniecībās, turklāt biežāk tā klātbūtni konstatējām sivēnmātēm (41.6%) un sešas nedēļas veciem sivēniem (35.1%). Lai arī biežāk un augstāku ESBL producējošā *E. coli* sastopamību novērojām lielajās saimniecībās (līdz 64%), tomēr arī mazajās saimniecībās var konstatēt augstu (47.5%) tā klātbūtni, norādot, ka saimniecības lielums ne vienmēr ir noteicošais faktors rezistentu baktēriju augstākai izplatībai.
3. Starp ESBL producējošiem *E. coli* ir novērojama ļoti augsta (96%) multirezistences izplatība, turklāt lielajās saimniecībās tie raksturojas ar plašākiem rezistences fenotipiem. Plaša amoksicilīna, cefalosporīnu, fluorohinolonu lietošana, kā arī cinka oksīda pievienošana barībai varētu būt veicinošie faktori multirezistentu ESBL producējošo *E. coli* izplatībai saimniecībās.
4. Latvijas cūkkopības saimniecībās visbiežāk konstatētie ESBL kodējošie gēni bija *bla*_{TEM} (94%) un *bla*_{CTX-M} (86%), retāk *bla*_{SHV} (48%). Mazajā saimniecībā ievērojami biežāk novērojām *bla*_{SHV}, savukārt lielajās – *bla*_{CTX-M}. Konstatējām statistiski nozīmīgas asociācijas starp gēnu *bla*_{SHV} un rezistenci pret ceftazidīmu, cefiksīmu un amoksicilīnu-klavulānskābi, bet gēnam *bla*_{CTX-M} – pret cefotaksīmu, cefaleksīnu un vairākām ne- β -laktāma antibiotikām, tādējādi apstiprinot faktu, ka ESBL kodējošie gēni bieži ir inkorporēti starp citiem rezistenci noteicošajiem gēniem.
5. Probiotikas saturošās papildbarības “ProbioHelp” iekļaušana barības devā samazināja ($p < 0.05$) *Enterobacteriaceae* (vidēji par 49%) un *E. coli* (vidēji par 43%) skaitu ($\log$ kvv g^{-1}) fekālijās sivēniem jau 35. dzīves dienā, savukārt pētījuma noslēgumā (sivēnu 56. dzīves dienā) konstatējām zarnu saturā *Lactobacillus* spp. skaita ($\log$ kvv g^{-1}) pieaugumu ($p < 0.05$) vidēji par 23%, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem.
6. Augu izcelsmes barības sastāvdaļu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) pievienošana sivēnu barībai ne tikai samazināja ($p < 0.05$) *Enterobacteriaceae* (vidēji par 39%) un *E. coli* (vidēji par 36%) skaitu ($\log$ kvv g^{-1}) fekālijās sivēnu 56. dzīves dienā, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvniekiem, bet samazināja arī rezistentu *E. coli* fenotipisko dažādību, tādējādi to iekļaušana barības devā varētu sekmēt antibakteriālās rezistences izplatības ierobežošanu cūkkopības saimniecībās.
7. Probiotikas saturoša papildbarība “ProbioHelp” palielināja ($p < 0.05$) *jejenum* bārktīņu garumu, VH:CD attiecību, enterocītu proliferāciju, skābo mucīnu producējošo kausveida šūnu skaitu tievajā un tendenciozi arī resnajā zarnā; savukārt augstāks ($p < 0.05$) intraepiteliālo limfocītu blīvums zarnās, kā arī T limfocītu relatīvais daudzums Peijera plātēs un *lamina propria* daļā, salīdzinot ar kontroles grupu, var liecināt par papildbarības imūnmodulējošo iedarbību.

8. Augu izcelsmes barības sastāvdaļu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) pievienošana sivēnu barībā palielināja ($p<0.05$) *jejenum* bārktiņu garumu, VH:CD attiecību un epitēlija šūnu proliferāciju; savukārt zemāks ($p<0.05$) intraepitēliālo limfocītu blīvums *jejenum*, kā arī augstāks ($p<0.05$) T limfocītu relatīvais daudzums Peijera platēs, resnās zarnas *lamina propria* daļā, salīdzinot ar kontroles grupu, var norādīt uz augu izcelsmes sastāvdaļu pretiekaisuma un imūnmodulējošām īpašībām.
9. Latvijas izcelsmes *T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana* ēteriskās eļļas uzrāda augstākas ($p<0.05$) MIC un MBC vērtības pret *E. coli*, kas skaidrojams ar sastāvā salīdzinoši augsto ogļūdeņražu monoterpēnu klātbūtni, norādot uz Latvijas izcelsmes ēterisko eļļu augstākas koncentrācijas nepieciešamību antibakteriālās efektivitātes nodrošināšanai.
10. Latvijas *T. serpyllum*, *T. vulgaris* un *S. montana* komerciālo ēterisko eļļu bagātināšana ar kaprīlskābi ļauj samazināt nepieciešamo minēto eļļu patēriņu attiecīgi par 29%, 51% un 64%, bet, bagātināšana ar 3% NaCl – attiecīgi par 63%, 78% un 69%. Bagātinātā *T. vulgaris* ēteriskā eļļa uzrādīja tendenci augstākai efektivitātei pret ESBL producējošiem *E. coli*, salīdzinot ar antibiotiku jutīgiem *E. coli* celmiem, tādējādi timiāna ēterisko eļļu varētu sekmīgi izmantot multirezistentu *E. coli* kontrolē.

PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Lai novērstu ESBL producējošu baktēriju strauju izplatību cūkkopības saimniecībās, ir nepieciešams veikt skrīningu uz ESBL producējošā *E. coli* klātbūtni, īpaši, ja saimniecībā sivēniem bieži konstatē diareju, profilaktiski perorāli tiek lietots cinka oksīds vai ārstēšanā tiek izmantotas fluorohinolonu un β -laktāmu grupas antibiotikas.
2. Lai samazinātu ESBL producējošo baktēriju izplatību produktīvajiem dzīvniekiem, rekomendējam kritiski svarīgas antibiotikas (3. un 4. paaudzes cefalosporīnus, fluorohinolonus) lietot tikai tad, ja zemākā kategorijā nav alternatīvu antibiotiku un lietošanas nepieciešamība ir pamatota ar antibiotiku jutīguma pārbaudes rezultātiem.
3. Rekomendējam augu (*Plantago major*, *Urtica dioica*, *Hypericum perforatum* 1:1:1) saturošu barības sastāvdaļu pievienošanu 1.5% apjomā sivēniem pamatbarībai no 14.-56. dzīves dienai, lai modulētu zarnu mikrobiotu adaptīvajā sivēnu atšķiršanas periodā, uzlabotu zarnu veselību un sekmētu imūnmodulējošo darbību zarnu traktā; turklāt ārstniecības augu piedeva ne tikai samazina fekālijās esošo *E. coli* skaitu, bet arī rezistento izolātu fenotipisko dažādību.
4. Bagātinot ēteriskās eļļas ar 1mM kaprīlskābes vai 3% NaCl piedevu, būtiski var samazināt nepieciešamās ēteriskās eļļas daudzumu.
5. Rekomendējam bagātināto *T. vulgaris* ēterisko eļļu izmantot virsmu dezinfekcijas līdzekļu izstrādē kā ESBL producējošā *E. coli* kontroles komponentu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. AACC. (2001). The Definition of Dietary Fiber. *CEREAL FOODS WORLD*, 46(3), 112–126.
2. Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(4), 271–281.
3. Abakuks, S., & Deters, A. M. (2012). Polysaccharides of St. John's Wort Herb Stimulate NHDF Proliferation and NEHK Differentiation via Influence on Extracellular Structures and Signal Pathways. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012, 1–11.
4. Akwar, H. T., Poppe, C., Wilson, J., Reid-Smith, R. J., Dyck, M., Waddington, J., Shang, D., & McEwen, S. A. (2008). Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 72(2), 195–201.
5. Albert, D., Zündorf, I., Dingermann, T., Müller, W. E., Steinhilber, D., & Werz, O. (2002). Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*, 64(12), 1767–1775.
6. Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., & Martínez, J. L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–11.
7. Arouca, C. L. C., Silva, F. C. de O., Fontes, D. D. O., Saraiva, A., Donzele, J. L., Silva, M. de A. e, & Paula, E. De. (2012). Available phosphorus in diets for 15 to 30 kg pigs genetically selected for meat deposition. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(1), 65–71.
8. Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Bohm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49–56.
9. Baldo, V., Salogni, C., Giovannini, S., D'Incau, M., Boniotti, M. B., Birbes, L., Pitozzi, A., Formenti, N., Grassi, A., Pasquali, P., & Alborali, G. L. (2020). Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 545818.
10. Balkhed, Å. Ö., Tärnberg, M., Monstein, H.-J., Hällgren, A., Hanberger, H., & Nilsson, L. E. (2013). High frequency of co-resistance in CTX-M-producing *Escherichia coli* to non-beta-lactam antibiotics, with the exceptions of amikacin, nitrofurantoin, colistin, tigecycline, and fosfomycin, in a county of Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45(4), 271–278.
11. Barilli, E., Vismarra, A., Villa, Z., Bonilauri, P., & Bacci, C. (2019). ESβL *E. coli* isolated in pig's chain: Genetic analysis associated to the phenotype and biofilm synthesis evaluation. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 162–167.
12. Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(4), 3989–4006.
13. Basu, S., & Mukherjee, M. (2018). Incidence and risk of co-transmission of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum β-lactamase genes in fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a first study from Kolkata, India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 217–223.
14. Beara, I. N., Orcic, D. Z., Lesjak, M. M., Mimica-Dukic, N. M., Pekovic, B. A., & Popovic, M. R. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of plantain (*Plantago* L.) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5), 701–706.
15. Becerril, R., Nerin, C., & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of Bacterial Resistance to Essential Oils and Antibiotics After Exposure to Oregano and Cinnamon Essential Oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(8), 699–705.
16. Bedenic, B., Vranes, J., Suto, S., & Zagar, Z. (2005). Bactericidal activity of oral β-lactam antibiotics in plasma and urine versus isogenic *Escherichia coli* strains producing broad-

- and extended-spectrum β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(6), 479–487.
17. Bednorz, C., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Hartmann, S., Neumann, K., Pieper, R., Bethe, A., Semmler, T., Tedin, K., Schierack, P., Wieler, L. H., & Guenther, S. (2013). The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 396–403.
 18. Belloc, C., Lam, D. N., Pellerin, J. L., Beaudeau, F., & Laval, A. (2005). Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 954–959.
 19. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154.
 20. Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pluchtová, M., Tali-Maama, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K., Grušová, D., Dugo, G., Marino, A., & Ben-Mahdi, M.-H. (2019). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla ESBL producing multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Natural Product Research*, 33(18), 2647–2654.
 21. Bergšpica, I., Kaprou, G., Alexa, E. A., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2020). Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics*, 9(10), 678.
 22. Bezabih, Y. M., Bezabih, A., Dion, M., Batard, E., Teka, S., Obote, A., Dessalegn, N., Enyew, A., Roujeinikova, A., Alamneh, E., Mirkazemi, C., Peterson, G. M., & Bezabhe, W. M. (2022). Comparison of the global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* between healthcare and community settings: a systematic review and meta-analysis. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(3), 1–12.
 23. Biasino, W., De Zutter, L., Garcia-Graells, C., Uyttendaele, M., Botteldoorn, N., Gowda, T., & Van Damme, I. (2018). Quantification, distribution and diversity of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* on freshly slaughtered pig carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 32–35.
 24. Bird, A. R., Vuaran, M., Brown, I., & Topping, D. L. (2007). Two high-amylose maize starches with different amounts of resistant starch vary in their effects on fermentation, tissue and digesta mass accretion, and bacterial populations in the large bowel of pigs. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 134–144.
 25. Blair, J. M., & Piddock, L. J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512–519.
 26. Boerlin, P., & White, D. G. (2013). Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 21–40). Wiley.
 27. Bok, E., Kozańska, A., Mazurek-Popczyk, J., Wojciech, M., & Baldy-Chudzik, K. (2020). Extended Phylogeny and Extraintestinal Virulence Potential of Commensal *Escherichia coli* from Piglets and Sows. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(1), 366.
 28. Bonafaccia, G., Marocchini, M., & Kreft, I. (2003). Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80, 9–15.
 29. Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1–14.
 30. Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. *Procedia Food Science*, 5, 18–21.

31. Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951.
32. Burch, D. G. S., & Sperling, D. (2018). Amoxicillin-current use in swine medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(3), 356–368.
33. Buret, A. G., Motta, J.-P., Allain, T., Ferraz, J., & Wallace, J. L. (2019). Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1–14.
34. Burkey, T. E., Skjolaas, K. A., & Minton, J. E. (2009). BOARD-INVITED REVIEW: Porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract¹. *Journal of Animal Science*, 87(4), 1493–1501.
35. Burow, E., & Käsbohrer, A. (2017). Risk Factors for Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* in Pigs Receiving Oral Antimicrobial Treatment: A Systematic Review. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 194–205.
36. Burow, E., Rostalski, A., Harlizius, J., Gangl, A., Simoneit, C., Grobbel, M., Kollas, C., Tenhagen, B. A., & Käsbohrer, A. (2019). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Preventive Veterinary Medicine*, 165, 52–62.
37. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
38. Bush, K., & Bradford, P. A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 295–306.
39. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976.
40. Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 147.
41. Callens, B., Faes, C., Maes, D., Catry, B., Boyen, F., Francoys, D., De Jong, E., Haesebrouck, F., & Dewulf, J. (2015). Presence of antimicrobial resistance and antimicrobial use in sows are risk factors for antimicrobial resistance in their offspring. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 21(1), 50–58.
42. Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR), 110.
43. Cantón, R., Morosini, M. I., Martin, O., de la Maza, S., Pedrosa, de la, & G., E. G. (2008). IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 53–62.
44. Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 1), 144–153.
45. Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), 477–485.
46. Cao, X. J., & Wang, W. M. (2009). Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38(4), 254–261.
47. Carson, F. L. (1997). Histotechnology: A Self-Instructional Text. In *ASCP Press* (2nd ed.).
48. Carvalho, I., Cunha, R., Martins, C., Martínez-Álvarez, S., Safia Chenouf, N., Pimenta, P., Pereira, A. R., Ramos, S., Sadi, M., Martins, Â., Façanha, J., Rabbi, F., Capita, R., Alonso-Calleja, C., de Lurdes Nunes Enes Dapkevicius, M., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2021). Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy and Sick Dogs Living in

- Portugal. *Antibiotics*, 10(8), 1013.
49. Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R. G., Carballeira, N. M., & Sanabria-Ríos, D. J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82, 101093.
 50. Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), 1–21.
 51. Chang, S. Y., Belal, S. A., Kang, D. R., Choi, Y. Il, Kim, Y. H., Choe, H. S., Heo, J. Y., & Shim, K. S. (2018). Influence of Probiotics-Friendly Pig Production on Meat Quality and Physicochemical Characteristics. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(2), 403.
 52. Chen, X., Xu, J., Ren, E., Su, Y., & Zhu, W. (2018). Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. *Anaerobe*, 49, 30–40.
 53. Cheng, S.-Y., Wang, B.-J., & Weng, Y.-M. (2015). Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 115–121.
 54. Cho, T. J., Park, S. M., Yu, H., Seo, G. H., Kim, H. W., Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2020). Recent Advances in the Application of Antibacterial Complexes Using Essential Oils. *Molecules*, 25(7), 1752.
 55. Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
 56. Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X., Fan, H., Liu, Z., Neelapu, S. S., & Dong, C. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature Medicine*, 17(8), 983–988.
 57. Ciesinski, L., Guenther, S., Pieper, R., Kalisch, M., Bednorz, C., & Wieler, L. H. (2018). High dietary zinc feeding promotes persistence of multi-resistant *E. coli* in the swine gut. *PLOS ONE*, 13(1), e0191660.
 58. CIPARS. (2022). Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2019: Pigs. In *Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario*.
 59. CLSI. (2018a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI standard M07 (11th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. www.clsi.org.
 60. CLSI. (2018b). *Performance Standards for Antimicrobial & Antifungal Susceptibility Testing*. M100 ED28:2018 (28th ed). Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI>
M100
ED28:2018&sbssok=CLSI M100 ED28:2018 TABLE
3A&format=HTML&hl=esbl#Search1
 61. Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Vasile, A., Bahrim, G. E., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2013). Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN BIO®, in synbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 261–268.
 62. Connelly, S., Subramanian, P., Hasan, N. A., Colwell, R. R., & Kaleko, M. (2018). Distinct consequences of amoxicillin and ertapenem exposure in the porcine gut microbiome. *Anaerobe*, 53, 82–93.
 63. Cook, & Sellin. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12(6), 499–507.
 64. Cooper, C. A., Moraes, L. E., Murray, J. D., & Owens, S. D. (2014). Hematologic and biochemical reference intervals for specific pathogen free 6-week-old Hampshire-

- Yorkshire crossbred pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1–5.
65. Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3(1–2), e982426.
 66. Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130–135.
 67. Cox, S. D., Mann, C. M., & Markham, J. L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 492–497.
 68. Cromwell, G. L. (2002). WHY AND HOW ANTIBIOTICS ARE USED IN SWINE PRODUCTION. *Animal Biotechnology*, 13(1), 7–27.
 69. Dahan, S., Roth-Walter, F., Arnaboldi, P., Agarwal, S., & Mayer, L. (2007). Epithelia: Lymphocyte interactions in the gut. *Immunological Reviews*, 215(1), 243–253.
 70. Das, D. J., Shankar, A., Johnson, J. B., & Thomas, S. (2020). Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition*, 69, 110567.
 71. Dawangpa, A., Lertwatcharasarakul, P., Boonsoongnern, A., Ratanavanichrojn, N., Sanguankiat, A., Pinniam, N., Jala, S., Laopiem, S., & Tulayakul, P. (2022). Multidrug resistance problems targeting piglets and environmental health by *Escherichia coli* in intensive swine farms. *Emerging Contaminants*, 8, 123–133.
 72. Day, M. J., Hopkins, K. L., Wareham, D. W., Toleman, M. A., Elviss, N., Randall, L., Teale, C., Cleary, P., Wiuff, C., Doumith, M., Ellington, M. J., Woodford, N., & Livermore, D. M. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12), 1325–1335.
 73. de Lange, C. F. M., Pluske, J., Gong, J., & Nyachoti, C. M. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*, 134(1–3), 124–134.
 74. De Lucia, A., Card, R. M., Duggett, N., Smith, R. P., Davies, R., Cawthraw, S. A., Anjum, M. F., Rambaldi, M., Ostanello, F., & Martelli, F. (2021). Reduction in antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from a pig farm following withdrawal of group antimicrobial treatment. *Veterinary Microbiology*, 258, 109125.
 75. Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808–816.
 76. Department of Health. (1994). *Nutritional aspects of cardiovascular disease : report of the Cardiovascular Review Group Committee on Medical Aspects of Food Policy*. H.M.S.O.
 77. Desantis, S., Mastrodonato, M., Accogli, G., Rossi, G., & Crovace, A. M. (2019). Effects of a probiotic on the morphology and mucin composition of pig intestine. *Histology and Histopathology*, 34(9), 1037–1050.
 78. Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642.
 79. Dewulf, J., Catry, B., Timmerman, T., Opsomer, G., de Kruif, A., & Maes, D. (2007). Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: Degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 78(3–4), 339–351.
 80. Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., & Chadee, K. (2009). Role of Intestinal Mucins in Innate Host Defense Mechanisms against Pathogens. *Journal of Innate Immunity*, 1(2), 123–135.
 81. Diarra, M. S., Silversides, F. G., Diarrassouba, F., Pritchard, J., Masson, L., Brousseau, R., Bonnet, C., Delaquis, P., Bach, S., Skura, B. J., & Topp, E. (2007). Impact of feed

- supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6566–6576.
82. Doğan, Ş., Gökalsın, B., Şenkardeş, İ., Doğan, A., & Sesal, N. C. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 235, 293–300.
 83. Dohmen, W., Bonten, M. J. M., Bos, M. E. H., van Marm, S., Scharringa, J., Wagenaar, J. A., & Heederik, D. J. J. (2015). Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(10), 917–923.
 84. Dohmen, W., Dorado-García, A., Bonten, M. J. M., Wagenaar, J. A., Mevius, D., & Heederik, D. J. J. (2017). Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLOS ONE*, 12(3), e0174094.
 85. Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32.
 86. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
 87. Duncker, S. C., Lorentz, A., Schroeder, B., Breves, G., & Bischoff, S. C. (2006). Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), 239–250.
 88. ECDC. (2014). *Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae through cross-border transfer of patients*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/systematic-review-effectiveness-infection-control-measures-prevent-transmission-0>
 89. EFSA, & ECDC. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. In *EFSA Journal* (Vol. 18, Issue 3). Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
 90. EFSA, & ECDC. (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. In *EFSA Journal* (Vol. 19, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd.
 91. Egeli, A. K., Framstad, T., & Morberg, H. (1998). Clinical Biochemistry, Haematology and Body Weight in Piglets. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(3), 381–393.
 92. El Aidy, S., Merrifield, C. A., Derrien, M., van Baarlen, P., Hooiveld, G., Levenez, F., Doré, J., Dekker, J., Holmes, E., Claus, S. P., Reijngoud, D.-J., & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut*, 62(9), 1306–1314.
 93. EMA, CVMP, & CHMP. (2020). *Categorisation of antibiotics in the European Union*. www.ema.europa.eu/contact
 94. Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M. B., & Petit, M.-A. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME Journal*, 11(1), 237–247.
 95. EUCAST. (2017a). EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. In *www.Eucast.Org* (Vol. 6, Issue January). www.eucast.org
 96. EUCAST. (2017b). *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0*. <http://www.eucast.org>.
 97. EUCAST. (2019). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019*.

<http://www.eucast.org>. <http://www.eucast.org>.

98. European Medicines Agency. (2021). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018: trends from 2010 to 2018: tenth ESVAC report. In *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (p. 101). Publications Office.
99. Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., & Wieler, L. H. (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: A global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 646–655.
100. Fairbrother, J. M., & Nadeau, É. (2019). Colibacillosis. In *Diseases of Swine* (pp. 807–834). Wiley.
101. Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 17–39.
102. Feng, W., Ao, H., & Peng, C. (2018). Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids, and Herbal Medicines. *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV), 1–12.
103. Field, D., Baghou, I., Rea, M., Gardiner, G., Ross, R., & Hill, C. (2017). Nisin in Combination with Cinnamaldehyde and EDTA to Control Growth of *Escherichia coli* Strains of Swine Origin. *Antibiotics*, 6(4), 35.
104. Fournier, C., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2020). Occurrence of CTX-M-15- and MCR-1-producing *Enterobacterales* in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(2), 105802.
105. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722–732.
106. Fuchs, F., & Hamprecht, A. (2019). Results from a Prospective In Vitro Study on the Mecillinam (Amdinocillin) Susceptibility of *Enterobacterales*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(4), e02402-18.
107. Gagne, D., Groulx, J.-F., Benoit, Y. D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P. H., & Beaulieu, J.-F. (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 387–400.
108. Galambosi, B., Rey, C., & Vouillamoz, J. F. (2010). Suitability of Swiss herb cultivars under Finnish climatic conditions. *Acta Horticulturae*, 860(860), 173–180.
109. Gallucci, M. N., Oliva, M. M., Casero Carina N., Dambolena, J. S., Luna, A., Zygodlo, J., & Demo, M. S. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 348–354.
110. Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., Ďuranová, H., Kowalczewski, P. Ł., Čmíková, N., & Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants*, 10(9), 1959.
111. Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Terentjeva, M., Štefániková, J., Ďuranová, H., Kowalczewski, P. Ł., & Kačániová, M. (2021). *Thymus serpyllum* Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver. *Plants*, 10(7), 1416.
112. Garcia-Graells, C., Berbers, B., Verhaegen, B., Vanneste, K., Marchal, K., Roosens, N. H. C., Botteldoorn, N., & De Keersmaecker, S. C. J. (2020). First detection of a plasmid located carbapenem resistant blaVIM-1 gene in *E. coli* isolated from meat products at retail in Belgium in 2015. *International Journal of Food Microbiology*, 324, 108624.
113. García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Flament-Simon, S. C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2018). Swine enteric colibacillosis

- in Spain: Pathogenic potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 2659.
114. Gay, N., Leclaire, A., Laval, M., Miltgen, G., Jégo, M., Stéphane, R., Jaubert, J., Belmonte, O., & Cardinale, E. (2018). Risk Factors of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016–2017. *Veterinary Sciences*, 5(1), 22.
 115. Georgiev, Y. N., Ognyanov, M. H., Kiyohara, H., Batsalova, T. G., Dzhambazov, B. M., Ciz, M., Denev, P. N., Yamada, H., Paulsen, B. S., Vasicek, O., Lojek, A., Barsett, H., Antonova, D., & Kratchanova, M. G. (2017). Acidic polysaccharide complexes from purslane, silver linden and lavender stimulate Peyer's patch immune cells through innate and adaptive mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 730–740.
 116. Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1438S–1441S.
 117. Giuberti, G., Gallo, A., Moschini, M., & Masoero, F. (2015). New insight into the role of resistant starch in pig nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 1–13.
 118. Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 1), 11–32.
 119. Gonçalves, P., Araújo, J. R., & Di Santo, J. P. (2018). A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(3), 558–572.
 120. Gong, J., Yin, F., Hou, Y., & Yin, Y. (2014). Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: Potential and challenges in application. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(2), 223–241.
 121. Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13), 2471.
 122. Gutzeit, C., Magri, G., & Cerutti, A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunological Reviews*, 260(1), 76–85.
 123. Gyles, C. L., & Fairbrother, J. (2010). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. In C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer, & C. O. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Vol. Fourth Edi*. Wiley-Blackwell.
 124. Haenen, D., Zhang, J., Souza da Silva, C., Bosch, G., van der Meer, I. M., van Arkel, J., van den Borne, J. J. G. C., Pérez Gutiérrez, O., Smidt, H., Kemp, B., Müller, M., & Hooiveld, G. J. E. J. (2013). A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine. *The Journal of Nutrition*, 143(3), 274–283.
 125. Haenni, M., Châtre, P., Métayer, V., Bour, M., Signol, E., Madec, J. Y., & Gay, E. (2014). Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 321–327.
 126. Hajiaghapour, M., & Rezaeipour, V. (2018). Comparison of two herbal essential oils, probiotic, and mannan-oligosaccharides on egg production, hatchability, serum metabolites, intestinal morphology, and microbiota activity of quail breeders. *Livestock Science*, 210, 93–98.
 127. Hajmeer, M., Ceylan, E., Marsden, J. L., & Fung, D. Y. C. (2006). Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy. *Food Microbiology*, 23(5), 446–452.
 128. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2012). Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial

- Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 909–915.
129. Hampson, D. J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, 40(1), 32–40.
 130. Han, F., Hu, L., Xuan, Y., Ding, X., Luo, Y., Bai, S., He, S., Zhang, K., & Che, L. (2013). Effects of high nutrient intake on the growth performance, intestinal morphology and immune function of neonatal intra-uterine growth-retarded pigs. *British Journal of Nutrition*, 110(10), 1819–1827.
 131. Hao, L., Su, W., Zhang, Y., Wang, C., Xu, B., Jiang, Z., Wang, F., Wang, Y., & Lu, Z. (2020). Effects of supplementing with fermented mixed feed on the performance and meat quality in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 266, 114501.
 132. Hao, Y., Xing, M., & Gu, X. (2021). Research Progress on Oxidative Stress and Its Nutritional Regulation Strategies in Pigs. *Animals*, 11(5), 1384.
 133. Hartadi, E. B., Helmi Effendi, M., Plumeriastuti, H., Sofiana, E. D., Wibisono, F. M., Hidayatullah, A. R., & Helmi, M. (2020). A Review of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Piglets: Public Health Importance. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 687–698.
 134. Hasnain, S. Z., Gallagher, A. L., Grecis, R. K., & Thornton, D. J. (2013). A new role for mucins in immunity: Insights from gastrointestinal nematode infection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(2), 364–374.
 135. Hayer, S. S., Rovira, A., Olsen, K., Johnson, T. J., Vannucci, F., Rendahl, A., Perez, A., & Alvarez, J. (2020). Prevalence and trend analysis of antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates collected from diseased pigs in the USA between 2006 and 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(5), 1930–1941.
 136. Holgate, S. T. (2007). Epithelium dysfunction in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6), 1233–1244.
 137. Hölzel, C. S., Müller, C., Harms, K. S., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., & Bauer, J. (2012). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, 113, 21–27.
 138. Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). HOW HOST-MICROBIAL INTERACTIONS SHAPE THE NUTRIENT ENVIRONMENT OF THE MAMMALIAN INTESTINE. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283–307.
 139. Hulánková, R., & Bořilová, G. (2011). In vitro combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Acta Veterinaria Brno*, 80(4), 343–348.
 140. Ibraliu, A., Dhillon, B. S., Faslia, N., & Stich, B. (2010). Variability of essential oil composition in Albanian accessions of *Satureja montana* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1359–1364.
 141. Imberechts, H., Bertschinger, H. U., Nagy, B., Deprez, P., & Pohl, P. (1997). Fimbrial Colonisation Factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* Isolated from Pigs with Postweaning Diarrhea and Edema Disease. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 412, pp. 175–183). Adv Exp Med Biol.
 142. Imperial, I. C. V. J., & Ibana, J. A. (2016). Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Frontiers in Microbiology*, 07, 1983.
 143. Ismail, A. S., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2009). Reciprocal Interactions between Commensal Bacteria and $\gamma\delta$ Intraepithelial Lymphocytes during Mucosal Injury. *The Journal of Immunology*, 182(5), 3047–3054.
 144. Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N., & Kishino, K. (1997). Changes of Lemon Flavor Components in an Aqueous Solution during UV Irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 463–466.
 145. Jahanbakhsh, S., Smith, M. G., Kohan-Ghadri, H.-R., Letellier, A., Abraham, S., Trott, D.

- J., & Fairbrother, J. M. (2016). Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 194–202.
146. Jensen, V. F., Emborg, H.-D., & Aarestrup, F. M. (2012). Indications and patterns of therapeutic use of antimicrobial agents in the Danish pig production from 2002 to 2008. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(1), 33–46.
 147. Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15064–15069.
 148. Kalily, E., Hollander, A., Korin, B., Cymerman, I., & Yaron, S. (2017). Adaptation of *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg to Linalool and Its Association with Antibiotic Resistance and Environmental Persistence. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10), 03398–16.
 149. Kalinová, J. P., Vrchotová, N., & Tříška, J. (2019). Phenolics levels in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) achenes. *Journal of Cereal Science*, 85, 243–248.
 150. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 321–335.
 151. Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M., & Doi, K. (1996). Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Experimental Animals*, 45(2), 155–160.
 152. Kang, L., Yap, C. W., Lim, P. F. C., Chen, Y. Z., Ho, P. C., Chan, Y. W., Wong, G. P., & Chan, S. Y. (2007). Formulation development of transdermal dosage forms: Quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin. *Journal of Controlled Release*, 120(3), 211–219.
 153. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.
 154. Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N., & Fanning, S. (2011). Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7113–7120.
 155. Kasagaki, S., Hashimoto, M., & Maeda, S. (2022). Subminimal inhibitory concentrations of ampicillin and mechanical stimuli cooperatively promote cell-to-cell plasmid transformation in *Escherichia coli*. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100130.
 156. Kato, M., Kephart, G. M., Talley, N. J., Wagner, J. M., Sarr, M. G., Bonno, M., McGovern, T. W., & Gleich, G. J. (1998). Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. *The Anatomical Record*, 252(3), 418–425.
 157. Keita, S. M., Vincent, C., Schmit, J.-P., & Bélanger, A. (2000). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 339–341.
 158. Khalifa, S. M., Abd El-Aziz, A. M., Hassan, R., & Abdelmegeed, E. S. (2021). β -lactam resistance associated with β -lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. *PLOS ONE*, 16(5), e0251594.
 159. Kiernan J. A. (2008). *Histological and Histochemical Methods* (4th ed). Scion Publishing Ltd.
 160. Kim, C. H., Park, J., & Kim, M. (2014). Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids, T Cells, and Inflammation. *Immune Network*, 14(6), 277.
 161. Kim, J., Jeon, S., Rhie, H., Lee, B., Park, M., Lee, H., Lee, J., & Kim, S. (2009). Rapid Detection of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) for *Enterobacteriaceae* by use of a Multiplex PCR-based Method. *Infection and Chemotherapy*, 41(3), 181.
 162. Kim, J. O., Yoo, I. Y., Yu, J. K., Kwon, J. A., Kim, S. Y., & Park, Y.-J. (2021). Predominance and clonal spread of CTX-M-15 in cefotaxime-resistant *Klebsiella*

- pneumoniae* in Korea and their association with plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(8), 1186–1192.
163. Kim, N. H., Kim, H. W., Moon, H., & Rhee, M. S. (2020). Sodium chloride significantly enhances the bactericidal actions of carvacrol and thymol against the halotolerant species *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. *LWT*, 122(Dec), 109015.
 164. Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2016). Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, *trans*-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O1. *Food Control*, 60, 447–454.
 165. Kisluk, G., Kalily, E., & Yaron, S. (2013). Resistance to essential oils affects survival of *Salmonella enterica* serovars in growing and harvested basil. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2787–2798.
 166. Klem, T. B., Bleken, E., Morberg, H., Thoresen, S. I., & Framstad, T. (2009). Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbreed grower pigs. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(2), 221–226.
 167. Kober, O. I., Ahl, D., Pin, C., Holm, L., Carding, S. R., & Juge, N. (2014). $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(7), G582–G593.
 168. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345.
 169. Komp Lindgren, P., Karlsson, A., & Hughes, D. (2003). Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3222–3232.
 170. Kovačević, Z., Radinović, M., Čabarkapa, I., Kladar, N., & Božin, B. (2021). Natural Agents against Bovine Mastitis Pathogens. *Antibiotics*, 10(2), 205.
 171. Krause, G., Zimmermann, S., & Beutin, L. (2005). Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology*, 106(1–2), 87–95.
 172. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16.
 173. Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007). Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 108(1–3), 82–93.
 174. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
 175. Langlois, B. E., Dawson, K. A., Cromwell, G. L., & Stahly, T. S. (1986). Antibiotic resistance in pigs following a 13 year ban. *Journal of Animal Science*, 62(3), 18–31.
 176. Lee, Y.-S., Kim, T.-Y., Kim, Y., Lee, S.-H., Kim, S., Kang, S. W., Yang, J.-Y., Baek, I.-J., Sung, Y. H., Park, Y.-Y., Hwang, S. W., O, E., Kim, K. S., Liu, S., Kamada, N., Gao, N., & Kweon, M.-N. (2018). Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host & Microbe*, 24(6), 833-846.e6.
 177. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Mills, A., Rushton, J., & Yeung, S. (2020). How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand. *BMJ Global Health*, 5(2), e001918.
 178. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., & Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, 7, 100058.
 179. Li, F., Xiong, X.-S., Yang, Y.-Y., Wang, J.-J., Wang, M.-M., Tang, J.-W., Liu, Q.-H., Wang, L., & Gu, B. (2021). Effects of NaCl Concentrations on Growth Patterns, Phenotypes Associated With Virulence, and Energy Metabolism in *Escherichia coli*

- BW25113. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705326.
180. Li, M., Li, Z., Zhong, Q., Liu, J., Han, G., Li, Y., & Li, C. (2022). Antibiotic resistance of fecal carriage of *Escherichia coli* from pig farms in China: a meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(16), 22989–23000.
 181. Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1374.
 182. Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331–343.
 183. Liu, C. H., Abrams, N. D., Carrick, D. M., Chander, P., Dwyer, J., Hamlet, M. R. J., Macchiarini, F., Prabhudas, M., Shen, G. L., Tandon, P., & Vedamony, M. M. (2017). Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. *Nature Immunology* 2017 18:11, 18(11), 1175–1180.
 184. Liu, H., Ji, H. F., Zhang, D. Y., Wang, S. X., Wang, J., Shan, D. C., & Wang, Y. M. (2015). Effects of *Lactobacillus brevis* preparation on growth performance, fecal microflora and serum profile in weaned pigs. *Livestock Science*, 178, 251–254.
 185. Liu, X., Liu, H., Wang, L., Peng, Q., Li, Y., Zhou, H., & Li, Q. (2018). Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* From Swine in Northwest China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1756.
 186. Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V., Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., & Stein, H. H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, 4(2), 113–125.
 187. Livermore, D. M., Day, M., Cleary, P., Hopkins, K. L., Toleman, M. A., Wareham, D. W., Wiuff, C., Doumith, M., & Woodford, N. (2019). OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(2), 326–333.
 188. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Nguyen, T., & Warner, M. (2011). Strategies to overcome extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC β -lactamases in shigellae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 405–409.
 189. Ložionė, K., & Venskutonis, P. R. (2006). Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus serpyllum* L. ssp. *serpyllum* Growing Wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*, 18(2), 206–211.
 190. Lugsomya, K., Yindee, J., Niyomtham, W., Tribuddharat, C., Tummaruk, P., Hampson, D. J., & Prapasarakul, N. (2018). Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Isolated from Pigs and Pork Derived from Farms Either Routinely Using or Not Using In-Feed Antimicrobials. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 1054–1066.
 191. Maeda, Y., Noda, S., Tanaka, K., Sawamura, S., Aiba, Y., Ishikawa, H., Hasegawa, H., Kawabe, N., Miyasaka, M., & Koga, Y. (2001). The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology*, 204(4), 442–457.
 192. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
 193. Malik, A., Nagy, B., Kugler, R., & Szmolka, A. (2017). Pathogenic potential and virulence genotypes of intestinal and faecal isolates of porcine post-weaning enteropathogenic *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science*, 115, 102–108.
 194. Mandrika, I., Kumar, S., Zandersone, B., Eranezhath, S. S., Petrovska, R., Liduma, I., Jezupovs, A., Pirags, V., & Tracevska, T. (2021). Antibacterial and Anti-Inflammatory Potential of Polyherbal Formulation Used in Chronic Wound Healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–13.

195. Manzanilla, E. G., Nofrarias, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J. F., Martin-Orue, S. M., Kamel, C., & Gasa, J. (2006). Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 103(10), 2743–2751.
196. Martel, J., Ko, Y.-F., Ojcius, D. M., Lu, C.-C., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Lai, H.-C., & Young, J. D. (2017). Immunomodulatory Properties of Plants and Mushrooms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(11), 967–981.
197. Martens, E. C. (2016). Fibre for the future. *Nature* 529:7585, 529(7585), 158–159.
198. Mathew, A. G. (2001). A comparison of antibiotic resistance in bacteria isolated from swine herds in which antibiotics were used or excluded. *Journal of Swine Health and Production*, 9(3), 125–129.
199. Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D801–D807.
200. Mesa-Varona, O., Boone, I., Flor, M., Eckmanns, T., Kaspar, H., Grobbel, M., & Tenhagen, B.-A. (2021). Comparison of Consumption Data and Phenotypical Antimicrobial Resistance in *E. coli* Isolates of Human Urinary Samples and of Weaning and Fattening Pigs from Surveillance and Monitoring Systems in Germany. *Antibiotics*, 11(1), 28.
201. Meslin, J. C., Fontaine, N., & Andrieux, C. (1999). Variation of mucin distribution in the rat intestine, caecum and colon: effect of the bacterial flora. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 123(3), 235–239.
202. Michiels, J., Missotten, J., van Hoorick, A., Ovin, A., Fremaut, D., de Smet, S., & Dierick, N. (2010). Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 64(2), 136–154.
203. Mjøs, S. A. (2004). Two-dimensional fatty acid retention indices. *Journal of Chromatography A*, 1061(2), 201–209.
204. Moeser, A. J., Ryan, K. A., Nighot, P. K., & Blikslager, A. T. (2007). Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, 413–421.
205. Moor, J., Aebi, S., Rickli, S., Mostacci, N., Overesch, G., Oppliger, A., & Hilty, M. (2021). Dynamics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in pig farms: A longitudinal study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(3), 106382.
206. Moubareck, C., Lecso, M., Pinloche, E., Butel, M. J., & Doucet-Populaire, F. (2007). Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae* in the gnotobiotic mouse digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 855–860.
207. Mourand, G., Paboeuf, F., Gripon, P., Lucas, P., Bougeard, S., Denamur, E., & Kempf, I. (2021). Impact of *Escherichia coli* probiotic strains ED1a and Nissle 1917 on the excretion and gut carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in pigs. *Veterinary and Animal Science*, 14, 100217.
208. Mowat, A. M., & Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Reviews*, 156, 145–166.
209. Müller, M., Essin, K., Hill, K., Beschmann, H., Rubant, S., Schempp, C. M., Gollasch, M., Boehncke, W. H., Harteneck, C., Müller, W. E., & Leuner, K. (2008). Specific TRPC6 Channel Activation, a Novel Approach to Stimulate Keratinocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33942–33954.
210. Munyaka, P. M., Echeverry, H., Yitbarek, A., Camelo-Jaimes, G., Sharif, S., Guenter, W., House, J. D., & Rodriguez-Lecompte, J. C. (2012). Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. *Poultry*

- Science*, 91(9), 2164–2172.
211. Navarro-Rocha, J., Andrés, M. F., Díaz, C. E., Burillo, J., & González-Coloma, A. (2020). Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja montana*. *Industrial Crops and Products*, 145(November 2019), 111958.
 212. Naziri, Z., Derakhshandeh, A., Soltani Borchaloe, A., Poormaleknia, M., & Azimzadeh, N. (2020). Treatment Failure in Urinary Tract Infections: A Warning Witness for Virulent Multi-Drug Resistant ESBL- Producing *Escherichia coli*. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 1839–1850.
 213. Nie, Q., Hu, J., Gao, H., Fan, L., Chen, H., & Nie, S. (2019). Polysaccharide from *Plantago asiatica* L. attenuates hyperglycemia, hyperlipidemia and affects colon microbiota in type 2 diabetic rats. *Food Hydrocolloids*, 86, 34–42.
 214. Nieto, G. (2017). Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines*, 4(3), 63.
 215. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190.
 216. Njoroge, S. M., Ukeda, H., Kusunose, H., Sawamura, M., Mjøs, S. A., Ngassoum, M. B., Yonkeu, S., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmaus, G., Hammerschmidt, F.-J., Keita, S., Vincent, C., Schmit, J. P., Bélanger, A., Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N., Kishino, K., ... Wedge, D. E. (1996). Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves and flowers from Cameroon and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(4), 25–29.
 217. Noriega, P. (2021). Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications. In *Terpenes and Terpenoids - Recent Advances* (pp. 1–13). IntechOpen.
 218. NRC. (2012). Nutrient Requirements of Swine. In *Nutrient Requirements of Swine*. National Academies Press.
 219. Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., & Dong, C. (2008). Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity*, 29(1), 138–149.
 220. O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688–693.
 221. Oh, M.-J., Choi, H.-D., Ha, S. K., Choi, I., & Park, H.-Y. (2018). Immunomodulatory effects of polysaccharide fraction isolated from *Fagopyrum esculentum* on innate immune system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(4), 1210–1216.
 222. Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2), 126–136.
 223. Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K.-H. S., & Galadari, S. (2015). Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacology & Therapeutics*, 152, 83–97.
 224. Ozgumus, O. B., Tosun, I., Aydin, F., & Kilic, A. O. (2008). Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 636–643.
 225. Paaver, U., Orav, A., Arak, E., Mäeorg, U., & Raal, A. (2008). Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Natural Product Research*, 22(2), 108–115.
 226. Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903.
 227. Papadopoulos, G. A., Poutahidis, T., Tallarico, N., Hardas, A., Teliousis, K., Arsenos, G.,

- & Fortomaris, P. D. (2017). Dietary supplementation of encapsulated organic acids enhances performance and modulates immune regulation and morphology of jejunal mucosa in piglets. *Research in Veterinary Science*, 115, 174–182.
228. Partridge, S. R. (2015). Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Pathology*, 47(3), 276–284.
 229. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17.
 230. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686.
 231. Peng, S., Herrero-Fresno, A., Olsen, J. E., & Dalsgaard, A. (2020). Influence of zinc on CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 613–619.
 232. Pereira, W. A., Franco, S. M., Reis, I. L., Mendonça, C. M. N., Piazzentin, A. C. M., Azevedo, P. O. S., Tse, M. L. P., De Martinis, E. C. P., Gierus, M., & Oliveira, R. P. S. (2022). Beneficial effects of probiotics on the pig production cycle: An overview of clinical impacts and performance. *Veterinary Microbiology*, 269, 109431.
 233. Pilmane, M., Rumba, I., Sundler, F., & Luts, A. (1998). Patterns of distribution and occurrence of neuroendocrine elements in lungs of humans with chronic lung diseases. *Latvian Academy of Sciences. Section B*, 144–152.
 234. Pissetti, C., Werlang, G. O., Kich, J. D., & Cardoso, M. (2017). Genotyping and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from pig carcasses. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(11), 1253–1260.
 235. Plaza-Díaz, J., Robles-Sánchez, C., Abadía-Molina, F., Sáez-Lara, M. J., Vilchez-Padial, L. M., Gil, Á., Gómez-Llorente, C., & Fontana, L. (2017). Gene expression profiling in the intestinal mucosa of obese rats administered probiotic bacteria. *Scientific Data*, 4(1), 170186.
 236. Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(suppl_1), S49–S66.
 237. Pluske, J. R., Hampson, D. J., & Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51(1), 215–236.
 238. Preidis, G. A., Saulnier, D. M., Blutt, S. E., Mistretta, T.-A., Riehle, K. P., Major, A. M., Venable, S. F., Finegold, M. J., Petrosino, J. F., Conner, M. E., & Versalovic, J. (2012). Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. *The FASEB Journal*, 26(5), 1960–1969.
 239. Prescott, J. F. (2013a). β -lactam Antibiotics. In S. Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 133–188). Wiley.
 240. Prescott, J. F. (2013b). Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (pp. 279–294). Wiley.
 241. Préstamo, G., Pedrazuela, A., Peñas, E., Lasunción, M. A., & Arroyo, G. (2003). Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. *Nutrition Research*, 23(6), 803–814.
 242. Raal, A., Paaver, U., Arak, E., & Orav, A. (2004). Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 40, 795–800.
 243. Radovanović, B., Anđelković, S., Radovanović, A., & Anđelković, M. (2013). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5), 813–819.
 244. Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. de L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase

- (ESBL) Production. *Animals*, 10(12), 2239.
245. Rani, S., Singh, H., & Ram, C. (2022). Efficacy and mechanism of carvacrol with octanoic acid against mastitis causing multi-drug-resistant pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 385–399.
 246. Rassem, H. H. A., Nour, A. H., & Yunus, R. M. (2016). AUSTRALIAN JOURNAL OF BASIC AND APPLIED SCIENCES Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16), 117–127.
 247. Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 614–619.
 248. Rawat, D., & Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263–274.
 249. Read, L. T., Hahn, R. W., Thompson, C. C., Bauer, D. L., Norton, E. B., & Clements, J. D. (2014). Simultaneous exposure to *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins increases fluid secretion and alters cyclic nucleotide and cytokine production by intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 82(12), 5308–5316.
 250. Reyns, T., De Boever, S., Schauvliege, S., Gasthuys, F., Meissonnier, G., Oswald, I., De Backer, P., & Croubels, S. (2009). Influence of administration route on the biotransformation of amoxicillin in the pig. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(3), 241–248.
 251. Rieger, J., Janczyk, P., Hünigen, H., Neumann, K., & Plendl, J. (2015). Intraepithelial lymphocyte numbers and histomorphological parameters in the porcine gut after *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 feeding in a *Salmonella* Typhimurium challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(1–2), 40–50.
 252. Robertson, A. M., & Wright, D. P. (1997). Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien de Gastroenterologie*, 11(4), 361–366.
 253. Roshini, J., Raj, M., & Karunasagar, I. (2017). Prevalence of bla CTX-M-15 in Coliphages Isolated from Sewage. *Advanced Science Letters*, 23(3), 1869–1871.
 254. Ross, G. R., Van Nieuwenhove, C. P., & González, S. N. (2012). Fatty acid profile of pig meat after probiotic administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5974–5978.
 255. Sacher, R. A., McPherson, R. A., Campos, J. M., & Widmann, F. K. (2000). *Widmann's clinical interpretation of laboratory tests*. F.A. Davis.
 256. Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511–521.
 257. Salah, F. D., Soubeiga, S. T., Ouattara, A. K., Sadj, A. Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., & Simporé, J. (2019). Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 104.
 258. Salyers, A. A., & Amabile-Cuevas, C. F. (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2321–2325.
 259. Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 10.
 260. Sarrazin, S., Joosten, P., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Mevius, D. J., Wagenaar, J. A., Heederik, D. J. J., Dewulf, J., Wagenaar, J., Graveland, H., Heederik, D., Schmitt, H., Luiken, R., Gompel, L. Van, Mevius, D., van Essen, A., Gonzalez-Zorn, B., Moyano, G., Sanders, P., ... Stärk, K. (2019). Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(3),

261. Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, A., Sauter-Louis, C., & Mansfeld, R. (2013). Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 3027–3032.
262. Schutte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M. E. V., Rodriguez-Pineiro, A. M., Backhed, F., Muller, S., Lottaz, D., Bond, J. S., & Hansson, G. C. (2014). Microbial-induced meprin cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12396–12401.
263. Schwarz S., A., C., & M.C., R. (2006). Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In Aarestrup FM (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 73–98). ASM Press.
264. Seale, J., & Millar, M. (2014). Perinatal vertical transmission of antibiotic-resistant bacteria: a systematic review and proposed research strategy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121(8), 923–928.
265. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., & Rizvi, S. M. D. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101.
266. Shramko, V. S., Polonskaya, Y. V., Kashtanova, E. V., Stakhneva, E. M., & Ragino, Y. I. (2020). The Short Overview on the Relevance of Fatty Acids for Human Cardiovascular Disorders. *Biomolecules*, 10(8), 1127.
267. Si, W., Gong, J., Chanas, C., Cui, S., Yu, H., Caballero, C., & Friendship, R. M. (2006). In vitro assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1282–1291.
268. Silva, N., Carvalho, I., Currie, C., Sousa, M., Igrejas, G., & Poeta, P. (2019). Extended-Spectrum- β -Lactamase and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Food-Producing Animals in Europe. In *Antibiotic Drug Resistance* (pp. 261–273). Wiley.
269. Slavkovska, V., Jancic, R., Bojovic, S., Milosavljevic, S., & Djokovic, D. (2001). Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry*, 57(1), 71–76.
270. Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 49–71.
271. Smelt, M. J., de Haan, B. J., Bron, P. A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J. M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2013). Probiotics Can Generate FoxP3 T-Cell Responses in the Small Intestine and Simultaneously Inducing CD4 and CD8 T Cell Activation in the Large Intestine. *PLoS ONE*, 8(7), e68952.
272. Smith, P. M., & Garrett, W. S. (2011). The Gut Microbiota and Mucosal T Cells. *Frontiers in Microbiology*, 2, 111.
273. Šojić, B., Pavlić, B., Tomović, V., Ikonić, P., Zeković, Z., Kocić-Tanackov, S., Đurović, S., Škaljac, S., Jokanović, M., & Ivić, M. (2019). Essential oil versus supercritical fluid extracts of winter savory (*Satureja montana* L.) – Assessment of the oxidative, microbiological and sensory quality of fresh pork sausages. *Food Chemistry*, 287(February), 280–286.
274. Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H., Diao, Q. Y., Shi, B., & Zou, X. T. (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science*, 93(3), 581–588.
275. SPKC. (2019). *Antibiotiku patēriņš un rezistence cilvēkiem un dzīvniekiem Latvijā 2015.-2019.gadā “Vienas veselības” ziņojums* (p. 41). Slimību profilakses un kontroles centrs.
276. Stein, H. H., & Kil, D. Y. (2006). Reduced Use of Antibiotic Growth Promoters in Diets Fed to Weanling Pigs: Dietary Tools, Part 2. *Animal Biotechnology*, 17(2), 217–231.

277. Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for Extracting Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 31–38). Elsevier.
278. Ström, G., Halje, M., Karlsson, D., Jiwakanon, J., Pringle, M., Fernström, L.-L., & Magnusson, U. (2017). Antimicrobial use and antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* on small- and medium-scale pig farms in north-eastern Thailand. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 75.
279. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267.
280. Suresh, A., Velusamy, S., Ayyasamy, S., & Rathinasamy, M. (2021). Techniques for essential oil extraction from kaffir lime and its application in health care products—A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(1), 5–21.
281. Suthongsa, S., Pichyangkura, R., Kalandakanond-Thongsong, S., & Thongsong, B. (2017). Effects of dietary levels of chito-oligosaccharide on ileal digestibility of nutrients, small intestinal morphology and crypt cell proliferation in weaned pigs. *Livestock Science*, 198, 37–44.
282. Szabó, M. Á., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., & Molnár, J. (2010). Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*, 24(5), 782–786.
283. Tabanca, N., Demirci, B., Baser, K. H. C., Aytac, Z., Ekici, M., Khan, S. I., Jacob, M. R., & Wedge, D. E. (2006). Chemical Composition and Antifungal Activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6593–6597.
284. Tan, C., Tang, X., Zhang, X., Ding, Y., Zhao, Z., Wu, B., Cai, X., Liu, Z., He, Q., & Chen, H. (2012). Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China. *The Veterinary Journal*, 192(3), 483–488.
285. Tan, L., Wang, F., Liang, M., Wang, X., Das, R., Mao, D., & Luo, Y. (2019). Antibiotic resistance genes attenuated with salt accumulation in saline soil. *Journal of Hazardous Materials*, 374, 35–42.
286. Tang, C., Ding, R., Sun, J., Liu, J., Kan, J., & Jin, C. (2019). The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses - a review. *Food & Function*, 10(5), 2290–2312.
287. Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 541340.
288. Taylor, J. R. N., & Emmambux, M. N. (2008). Gluten-free foods and beverages from millets. In E. K. Arendt & F. D. Bello (Eds.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (pp. 119–V). Elsevier.
289. Thumann, T. A., Pferschy-Wenzig, E.-M., Moissl-Eichinger, C., & Bauer, R. (2019). The role of gut microbiota for the activity of medicinal plants traditionally used in the European Union for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 112153.
290. Trckova, M., Faldyna, M., Alexa, P., Sramkova Zajacova, Z., Gopfert, E., Kumprechtova, D., Auclair, E., & D’Inca, R. (2014). The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets,. *Journal of Animal Science*, 92(2), 767–774.
291. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568.
292. Uni, Z. (2006). Early development of small intestinal function. In G. C. Perry (Ed.), *Avian gut function in health and disease* (1st ed., pp. 29–42). CABI.
293. USDA - APHIS. (2016). *Escherichia coli* on U.S. Swine Sites: Prevalence and Antimicrobial Drug Susceptibility Background.

294. Ushida, K., & Hoshi, S. (2002). ¹³C-NMR Studies on Lactate Metabolism in a Porcine Gut Microbial Ecosystem. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(4), 242–247.
295. van Beers-Schreurs, H. M. G., Vellenga, L., Wensing, T., & Breukink, H. J. (1992). The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. *Veterinary Quarterly*, 14(1), 29–34.
296. Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654.
297. Van Hung, P., Maeda, T., & Morita, N. (2009). Buckwheat Starch: Structure and Characteristics-A Review. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 23–28.
298. Van Wijk, F., & Cheroutre, H. (2010). Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert Review of Clinical Immunology*, 6(4), 559–566.
299. Varga, C., Rajić, A., McFall, M. E., Reid-Smith, R. J., Deckert, A. E., Checkley, S. L., & McEwen, S. A. (2009). Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(3), 185–192.
300. Vega-Lopez, M. A., Arenas-Contreras, G., Bailey, M., Gonzalez-Pozos, S., Stokes, C. R., Ortega, M. G., & Mondragon-Flores, R. (2001). Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Developmental Immunology*, 8(2), 147–158.
301. Vega-López, M. A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K., & Stokes, C. R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the *lamina propria*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 37(1), 49–60.
302. Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M. E., Filippi, A., Frascchetti, C., Rinaldi, F., Aleandri, M., Goldoni, P., Conte, M. P., Ammendolia, M. G., & Longhi, C. (2019). *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*, 126, 323–331.
303. Von Salviati, C., Friese, A., Roschanski, N., Laube, H., Guerra, B., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L., & Roesler, U. (2014). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 127(9–10), 412–419.
304. von Salviati, C., Laube, H., Guerra, B., Roesler, U., & Friese, A. (2015). Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology*, 175(1), 77–84.
305. Walker, M., Patel, K., & Stappenbeck, T. (2009). The stem cell niche. *The Journal of Pathology*, 217(2), 169–180.
306. Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016). Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–13.
307. Wang, J., Xiao, Y., Li, J., Qi, M., & Tan, B. (2021). Serum biochemical parameters and amino acids metabolism are altered in piglets by early-weaning and proline and putrescine supplementations. *Animal Nutrition*, 7(2), 334–345.
308. Wang, L., Yang, X., Qin, P., Shan, F., & Ren, G. (2013). Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Industrial Crops and Products*, 49, 312–317.
309. Wang, X., & Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(4), 373–380.
310. Wesolowska, A., Grzeszczuk, M., Jadczyk, D., Nawrotek, P., & Struk, M. (2015).

- Comparison of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Thymus serpyllum* Essential Oils. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 432–438.
311. WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247201> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 312. WHO. (2015). Antimicrobial resistance. In *Fact Sheet 194*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
 313. WHO. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. In *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>
 314. Wiarda, J. E., Trachsel, J. M., Bond, Z. F., Byrne, K. A., Gabler, N. K., & Loving, C. L. (2020). Intraepithelial T Cells Diverge by Intestinal Location as Pigs Age. *Frontiers in Immunology*, 11, 1139.
 315. Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2007). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(No 14, Sup 2008), E140–E148.
 316. Wiyaporn, M., Thongsong, B., & Kalandakanond-Thongsong, S. (2013). Growth and small intestine histomorphology of low and normal birth weight piglets during the early suckling period. *Livestock Science*, 158(1–3), 215–222.
 317. Wood, J. M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. *Journal of General Physiology*, 145(5), 381–388.
 318. Wu, R. Y., Määttänen, P., Napper, S., Scruten, E., Li, B., Koike, Y., Johnson-Henry, K. C., Pierro, A., Rossi, L., Botts, S. R., Surette, M. G., & Sherman, P. M. (2017). Non-digestible oligosaccharides directly regulate host kinome to modulate host inflammatory responses without alterations in the gut microbiota. *Microbiome*, 5(1), 135.
 319. Xie, M. M., & Dent, A. L. (2018). Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center. *Frontiers in Immunology*, 9, 1536.
 320. Xiong, W., Huang, J., Li, X., Zhang, Z., Jin, M., Wang, J., Xu, Y., & Wang, Z. (2020). Icariin and its phosphorylated derivatives alleviate intestinal epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* through modulate p38 MAPK in vivo and in vitro. *FASEB Journal*, 34(1), 1783–1801.
 321. Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618.
 322. Yahfoufi, N., Mallet, J., Graham, E., & Matar, C. (2018). Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. *Current Opinion in Food Science*, 20, 82–91.
 323. Yan, L., Meng, Q. W., & Kim, I. H. (2012). Effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in weanling pigs. *Livestock Science*, 145(1–3), 189–195.
 324. Yoon, B., Jackman, J., Valle-González, E., & Cho, N.-J. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1114.
 325. Yuan, D., Hussain, T., Tan, B., Liu, Y., Ji, P., & Yin, Y. (2017). The Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Eucommia ulmoides* Flavones Using Diquat-Challenged Piglet Models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8140962.
 326. Zadrozny, L. M., Stauffer, S. H., Armstrong, M. U., Jones, S. L., & Gookin, J. L. (2006). Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity*, 74(10), 5497–5505.
 327. Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 7.

328. Zeynudin, A., Pritsch, M., Schubert, S., Messerer, M., Liegl, G., Hoelscher, M., Belachew, T., & Wieser, A. (2018). Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 524.
329. Zhang, D., Liu, H., Wang, S., Zhang, W., Wang, J., Tian, H., Wang, Y., & Ji, H. (2019). Fecal Microbiota and Its Correlation With Fatty Acids and Free Amino Acids Metabolism in Piglets After a *Lactobacillus* Strain Oral Administration. *Frontiers in Microbiology*, 10, 785.
330. Zhang, D., Wang, L., Tan, B., & Zhang, W. (2020). Dietary fibre extracted from different types of whole grains and beans: a comparative study. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2188–2196.
331. Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., & Francis, D. (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology*, 123(1–3), 145–152.
332. Zhang, W., Zhu, Y.-H., Zhou, D., Wu, Q., Song, D., Dicksved, J., & Wang, J.-F. (2017). Oral Administration of a Select Mixture of *Bacillus* Probiotics Affects the Gut Microbiota and Goblet Cell Function following *Escherichia coli* Challenge in Newly Weaned Pigs of Genotype MUC4 That Are Supposed To Be Enterotoxigenic *E. coli* F4ab/ac Receptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3), e02747-16.
333. Zhao, J., Bai, Y., Tao, S., Zhang, G., Wang, J., Liu, L., & Zhang, S. (2019). Fiber-rich foods affected gut bacterial community and short-chain fatty acids production in pig model. *Journal of Functional Foods*, 57, 266–274.
334. Zhao, J., Liu, P., Wu, Y., Guo, P., Liu, L., Ma, N., Levesque, C., Chen, Y., Zhao, J., Zhang, J., & Ma, X. (2018). Dietary Fiber Increases Butyrate-Producing Bacteria and Improves the Growth Performance of Weaned Piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 7995–8004.
335. Zhu, C., WANG, L., WEI, S., CHEN, Z., MA, X., ZHENG, C., & JIANG, Z. (2017). Effect of yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on serum antioxidant capacity, mucosal sIgA secretions and gut microbial populations in weaned piglets. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(9), 2029–2037.
336. Zhu, F. (2020). Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116819.
337. Zhu, Y., Dong, W., Ma, J., Yuan, L., Hejair, H. M. A., Pan, Z., Liu, G., & Yao, H. (2017). Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 94.
338. Zimmermann, J. A., Fusari, M. L., Rossler, E., Blajman, J. E., Romero-Scharpen, A., Astesana, D. M., Olivero, C. R., Berisvil, A. P., Signorini, M. L., Zbrun, M. V., Frizzo, L. S., & Soto, L. P. (2016). Effects of probiotics in swines growth performance: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 280–293.
339. ZOU, Y., WEI, H. K., XIANG, Q.-H., WANG, J., ZHOU, Y.-F., & PENG, J. (2016). Protective effect of quercetin on pig intestinal integrity after transport stress is associated with regulation oxidative status and inflammation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(9), 1487–1494.
340. Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016). Oregano Essential Oil Improves Intestinal Morphology and Expression of Tight Junction Proteins Associated with Modulation of Selected Intestinal Bacteria and Immune Status in a Pig Model. *BioMed Research International*, 2016, 5436738.

PIELIKUMI

Skaidrojums sivēnu ēdināšanas un paraugu iegūšanas aktivitātēm atbilstoši likumdošanas regulējumam

1. Pētījumā izmantoto dzīvnieku barības komponentu lietošanas normatīvais regulējums

Pamatojoties uz Eiropas Parlamenta un Padomes 2003.gada 22.septembra Regulas (EK) Nr. 1831/2003 par dzīvnieku ēdināšanā lietotām piedevām 2. panta 2. punkta a) un d) apakšpunktos noteikto, pētījumā izmantotais probiotikas saturošais līdzeklis "**ProbioHelp**" nav klasificējams kā lopbarības piedeva, bet saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes 2009.gada 13.jūlija Regulas (EK) Nr. 767/2009 par barības laišanu tirgū un lietošanu un ar ko groza Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1831/2003, un atceļ Padomes Direktīvu 79/373/EEK, Komisijas Direktīvu 80/511/EEK, Padomes Direktīvas 82/471/EEK, 83/228/EEK, 93/74/EEK, 93/113/EK un 96/25/EK un Komisijas Lēmumu 2004/217/EK, (turpmāk – Regula (EK) Nr. 767/2009) līdzeklis "**ProbioHelp**" ir klasificējams kā **papildbarība izbarošanai atšķirtiem sivēniem**.

Minēto papildbarību Latvijā šobrīd izplata SIA „Baltic Probiotics" (Pārtikas un veterinārā dienesta reģistrācijas numurs 065014)

[https://balticprobiotics.lv/shop/lopkopiba/product/probiohelp-papildbariba-atskirtiem-siveniem-](https://balticprobiotics.lv/shop/lopkopiba/product/probiohelp-papildbariba-atskirtiem-siveniem-11)

11

Probiotiskais līdzeklis (papildbarība) pētījumā tika lietots saskaņā ar ražotāja izstrādātās lietošanas instrukcijas norādījumiem.

Saskaņā ar Eiropas Komisijas 2013. gada 16. janvāra Regulas (ES) Nr. 68/2013, ar ko izveido barības sastāvdaļu reģistru Pielikuma C daļu "Barības sastāvdaļu saraksts", pētījumā izmantotās griķu klijas ir ietvertas barības sastāvdaļu reģistra sadaļas "Citas sēklas un augļi un no tiem iegūti produkti" 5.6.2. apakšpunktā. Tādējādi tās ir atļauts lietot dzīvnieku barībā bez ierobežojuma. Bio **Griķu klijas** tika iegādātas saimniecības ZS "Bebri" uzņēmumā <https://dabadaba.lv/product/bebri-bio-griku-klijas-250g>.

Pētījumā izmantotie **Latvijas florā** plaši **sastopamie augi** atbilst Regulas (EK) Nr. 767/2009 3. panta 2. punkta g) apakšpunktā noteiktajai "barības sastāvdaļu" definīcijai. Saskaņā ar spēkā esošajiem dzīvnieku barības apriti reglamentējošajiem normatīvajiem aktiem, dzīvnieku barības sastāvdaļas netiek pakļautas iepriekšējas paziņošanas, izvērtēšanas, atzīšanas vai reģistrācijas procedūrām.

2. Pētījumā ietverto paraugu ieguves normatīvais regulējums

Pētījums tika realizēts PVD reģistrētā cūkkopības saimniecībā, kurā atradās arī atzīta kautuve. Prasības zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzībai ir noteiktas Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvā 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. Minētās Direktīvas prasības Latvijā uz pētījuma brīdi bija ietvertas Ministru kabineta 2013. gada 22. janvāra Noteikumos Nr.52 "Noteikumi par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību" (turpmāk – Noteikumi Nr.52). Veiktais sivēnu ēdināšanas pētījums bija klasificējams atbilstoši Noteikumu Nr.52 5. punkta 5.6. apakšpunktam: "5. Noteikumi neattiecas uz: 5.6. praktiskām darbībām, kas neizraisa sāpes, ciešanas, diskomfortu vai ilgstošu kaitējumu, kurš līdzvērtīgs vismaz adatas ievadīšanai atbilstoši labai veterinārmedicīniskai praksei." Tādējādi dzīvnieku ēdināšanas darbības nepakļaujas Noteikumu Nr.52 tvērumam. No pētījumā iekļautajiem 44 sivēniem tika nokauti atsevišķi sivēni uzņēmuma saimnieciskās darbības vajadzībām, kas klasificējams kā neeksperimentālā lauksaimniecība atbilstoši Noteikumu Nr.52 5. punkta 5.1.apakšpunktam. Ņemot vērā, ka pētījumā lietotie barības komponenti bija apstiprināti un nekaitīgi izbarošanai cūkām, tas neradīja apdraudējumu patērētāju veselībai un drošībai. No dzīvnieku aizsardzības viedokļa šis pētījums netika klasificēts kā eksperiments, jo dzīvniekiem izbarojot atļautus barības līdzekļus, kā arī veicot vispārpieņemtas manipulācijas (tostarp dzīvnieku nokaušanu) mūsu pētījuma laikā veiktās darbības ir klasificējamās kā neeksperimentālā lauksaimniecība. Tādējādi, pamatojoties uz visu iepriekšminēto, uz pētījumā iekļautajām darbībām neattiecas Noteikumu Nr.52 prasības.

Komerčiālos un laboratorijas apstākļos iegūtu ēterisko eļļu ķīmiskie savienojumi, $\bar{x} \pm SD$

RI	Komponentu nosaukumi	Saturš, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
		C	LV	C	LV	C	LV
1015	cis-p-menthane ¹	4.1±0.1 (0.16)	—	—	—	—	—
1022	α-pinene ¹	—	—	32.2±0.5 (0.63)	50.7±3.9 (0.99)	56.9±3.0 (1.30)	20.8±0.6 (0.35)
1023	β-terpinen ¹	92.5±4.6 (3.60)	21.4±1.2 (0.87)	—	—	—	—
1027	α-thujene ¹	3.6±0.2 (0.14)	35.8±1.4 (1.46)	15.4±0.5 (0.30)	99.6±8.4 (1.94)	137.5±12.6 (3.14)	40.9±3.0 (0.70)
1039	trans-p-menthane ¹	4.2±0.3 (0.17)	—	—	—	—	—
1058	α-fenchene ¹	10.1±0.5 (0.39)	—	—	—	—	—
1065	camphene ¹	49.8±2.0 (1.94)	15.9±0.7 (0.65)	30.5±0.6 (0.60)	20.0±1.8 (0.39)	13.9±0.7 (0.32)	17.9±0.9 (0.30)
1107	β-pinene ¹	12.6±0.9 (0.49)	9.3±0.6 (0.38)	9.4±0.0 (0.19)	16.7±1.2 (0.32)	17.1±0.9 (0.39)	12.1±0.6 (0.21)
1122	sabinen ¹	—	5.8±0.4 (0.24)	—	11.4±0.4 (0.22)	4.8±0.2 (0.11)	70.1±3.0 (1.19)
1132	dehydrosabinene ¹	—	—	4.2±0.0 (0.08)	3.8±0.2 (0.07)	3.8±0.2 (0.09)	—
1136	carvomenthene ¹	6.8±0.3 (0.26)	—	—	—	—	—
1149	δ-3-carene ¹	—	4.9±0.4 (0.24)	5.1±0.2 (0.10)	7.5±0.5 (0.15)	9.9±1.1 (0.23)	5.0±0.2 (0.08)
1165	β-myrcene+α-phellandrene ¹	38.8±3.4 (1.51)	54.3±2.4 (0.20)	58.0±1.3 (1.14)	172.8±15.2 (3.36)	188.0±17.7 (4.30)	201.7±15.6(3.43)
1170	pseudolimonene ¹	4.4±0.4 (0.17)	—	—	—	—	—
1181	α-terpinene ¹	11.2±0.5 (0.44)	40.6±2.2 (1.66)	70.3±0.4 (1.39)	142.8±11.0 (2.78)	96.8±7.3 (2.21)	132.6±6.6 (2.25)
1200	limonene ¹	91.1±10.1 (3.55)	13.9±0.6 (0.57)	16.4±0.3 (0.32)	44.1±3.0 (0.86)	18.8±0.9 (0.43)	25.3±0.7 (0.43)
1210	1,8-cineole ²	42.8±3.7 (1.67)	29.4±1.9 (1.20)	30.6±0.3 (0.60)	58.4±6.3 (1.14)	40.5±2.4 (0.93)	16.3±0.7 (0.28)
1226	2-hexenal ⁶	—	—	—	4.5±0.1 (0.09)	—	—
1237	β-cis-ocimene ¹	—	—	25.7±0.7 (0.51)	17.0±1.5 (0.33)	6.9±0.6 (0.16)	58.9±4.2 (1.00)
1249	γ-terpinene ¹	149.0±15.2 (5.81)	437.8±16.3 (17.83)	336.7±8.3 (6.64)	1152.1±50.7(22.42)	404.4±28.7 (9.24)	1291.0±18.4 (21.93)
1254	β-trans-ocimene ¹	—	3.4±0.1 (0.14)	5.9±0.2 (0.12)	9.6±3.2 (0.19)	6.8±1.0 (0.16)	18.4±5.7 (0.31)
1258	3-octanone ⁶	—	4.9±0.1 (1.20)	—	—	—	11.3±0.3 (0.19)
1275	p-cymene ¹	908.5±35.9 (35.4)	580.2±22.6 (23.63)	660.1±21.9 (13.02)	543.6±42.6 (10.58)	358.0±30.1 (8.18)	526.6±29.7 (8.94)
1286	terpinolene ¹	—	6.0±0.3 (0.25)	10.6±0.1 (0.21)	10.7±0.5 (0.21)	11.5±0.8 (0.26)	25.0±1.0 (0.42)
1308	o-cymene ¹	4.3±0.1 (0.17)	—	—	—	—	—
1320	(Z)-3-hexenyl acetate ⁸	—	3.0±0.1 (0.12)	—	4.1±0.2 (0.08)	—	8.6±0.3 (0.15)
1342	4-pentenyl butyrate ⁸	—	7.0±0.3 (0.28)	—	—	—	—
1343	sulcatone ⁶	—	—	—	—	—	8.4±0.1 (0.14)
1386	3-hexen-1-ol ⁷	—	7.6±0.4 (0.31)	—	14.4±1.3 (0.28)	3.0±0.1 (0.08)	—

2. pielikuma turpinājums

RI	Komponentu nosaukumi	Saturis, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
		C	LV	C	LV	C	LV
1392	3-octanol ⁷	—	6.4±0.5 (0.26)	6.0±0.0 (0.12)	10.2±0.5(0.20)	11.2±0.2 (0.26)	10.1±0.5 (0.17)
1399	nonanal ⁶	—	—	—	—	—	5.6±0.1 (0.10)
1406	1-hepten-3-ol ⁷	—	—	—	3.9±0.7 (0.08)	—	—
1407	fenchone ²	3.4±0.1 (0.13)	—	—	—	—	—
1432	photocitral B ²	—	—	—	—	—	4.9±0.3 (0.08)
1434	β-thujone ²	5.3±0.3 (0.21)	—	—	—	—	—
1450	1-octen-3-ol ⁷	—	28.9±1.9 (1.18)	65.0±1.2 (1.28)	161.5±22.0 (3.14)	—	42.3±1.5 (0.72)
1449	trans-linalool furanoxide ²	4.0±0.2 (0.16)	—	—	—	—	—
1453	α-thujone ²	3.7±0.2 (0.14)	—	—	—	—	—
1468	trans-sabinene hydrate ²	3.3±0.0 (0.13)	16.5±1.0 (0.67)	26.4±0.2 (0.52)	31.0±3.7 (0.60)	—	60.7±2.5 (1.03)
1475	cis-linalool furanoxide ²	3.9±0.2 (0.15)	—	—	—	3.8±0.4 (0.09)	—
1477	Isoledene ⁴	—	—	6.9±0.7 (0.14)	—	—	—
1478	nerol oxide ²	—	—	—	—	—	4.4±0.2 (0.08)
1493	α-ylangene ⁵	—	—	5.1±0.2 (0.1)	—	—	—
1496	epiphotocitral A ²	—	—	—	—	—	5.7±0.4 (0.10)
1503	α-copaene ⁵	3.2±0.1 (0.13)	—	10.9±0.6 (0.21)	4.2±0.6 (0.08)	4.5±0.4 (0.10)	—
1504	dihydroedulan ⁹	—	—	—	—	—	—
1507	decanal ⁶	—	—	—	—	—	5.3±0.2 (0.09)
1519	1-nonen-3-ol ⁷	—	—	4.8±0.2 (0.10)	5.6±0.4 (0.11)	—	—
1531	β-bourbonene ⁴	—	—	10.1±0.3 (0.20)	6.3±0.9 (0.12)	—	19.2±1.4 (0.33)
1533	camphor ²	8.2±0.7 (0.32)	13.3±0.7 (0.54)	5.9±0.2 (0.12)	—	—	—
1542	α-gurjunene ⁴	—	—	4.2±0.3 (0.08)	—	—	—
1548	β-linalool ²	187.5±13.9 (7.31)	88.0±7.0 (3.58)	35.2±1.0 (0.69)	103.5±10.5(2.01)	138.7±10.0 (3.17)	11.2±0.8 (0.19)
1554	cis-sabinene hydrate ²	—	6.9±0.5 (0.28)	13.6±0.2 (0.27)	9.5±0.7 (0.19)	14.8±1.2 (0.34)	—
1555	isoneral ²	—	—	—	—	—	11.6±1.6 (0.20)
1565	Cinerone ⁶	—	—	—	—	—	—
1570	trans-p-menth-2-en-1-ol ²	—	4.4±0.2 (0.18)	4.6±0.1 (0.09)	6.0±0.2 (0.12)	5.3±0.5 (0.12)	6.3±0.3 (0.11)
1582	p-menth-3-en-1-ol ²	3.1±0.1 (0.12)	—	—	—	—	—
1582	isogeranial ²	—	—	—	—	—	11.2±0.5 (0.19)
1614	β-caryophyllene ⁴	42.3±3.6 (1.65)	79.3±4.9 (3.23)	728.6±25.6(14.37)	173.4±17.4 (3.37)	149.7±10.3 (3.42)	735.4±26.9 (12.49)
1586	β-ylangene ⁴	—	—	4.2±0.3 (0.08)	3.8±0.2 (0.07)	—	5.4±0.4 (0.09)
1593	bornyl acetate ⁸	4.6±0.2 (0.18)	8.0±0.3 (0.32)	9.6±0.1 (0.19)	—	—	4.9±0.1 (0.08)

2. pielikuma turpinājums

RI	Komponentu nosaukumi	Saturis, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
		C	LV	C	LV	C	LV
1594	α-bergamotene ⁴	—	—	—	—	—	—
1602	β-elemen ⁴	—	—	—	—	—	—
1602	methylthymol ³	—	28.9±1.7 (1.18)	7.1±0.1 (0.14)	3.8±0.1 (0.07)	—	69.1±3.2 (1.17)
1606	β-copaene ⁴	—	—	4.3±0.2 (0.08)	4.2±0.3 (0.08)	3.5±0.1 (0.08)	4.5±0.2 (0.08)
1618	β-panasinsene ⁴	—	—	7.8±2.3 (0.15)	—	—	—
1624	Aromandendrene ⁴	—	—	48.5±0.3 (0.96)	—	11.9±1.0 (0.27)	—
1626	trans-dihydrocarvone ²	—	4.1±0.1 (0.17)	—	—	8.6±0.4 (0.20)	—
1632	selina-5,11-diene ⁴	—	—	4.4±0.3 (0.09)	—	—	—
1636	cis-p-menth-2-en-1-ol ²	—	—	—	4.6±0.5 (0.09)	—	5.2±0.9 (0.09)
1637	p-menth-8-en-1-ol ²	3.8±0.1 (0.14)	—	—	—	—	—
1646	cis-dihydrocarvone ²	—	—	—	—	5.7±0.1 (0.13)	—
1653	1-decen-3-ol ⁷	—	—	—	—	—	4.9±0.2 (0.080)
1663	allo-aromadendrene ⁴	—	—	9.5±0.3 (0.19)	—	—	11.3±0.7 (0.19)
1671	trans-β-farnesene ⁴	—	—	—	—	—	4.1±0.2 (0.07)
1674	cadina-1(6),4-diene ⁴	—	—	3.6±0.1 (0.10)	—	—	—
1678	isoborneol ²	3.6±0.1 (0.14)	—	—	—	—	—
1680	lavandulol ²	—	4.4±0.1 (0.18)	—	—	—	—
1681	δ-terpineol ²	—	—	—	4.3±0.1 (0.08)	—	—
1687	α-humulene ⁴	4.6±0.2 (0.18)	4.4±0.2 (0.18)	10.9±0.2 (0.22)	6.7±0.6 (0.13)	6.3±0.4 (0.14)	20.2±2.0 (0.34)
1696	β-citral ²	—	3.5±0.1 (0.32)	—	—	—	111.6±7.9 (1.90)
1703	γ-murolene ⁴	—	—	18.3±0.8 (0.36)	—	—	—
1703	α-terpineol ²	8.5±0.5 (0.33)	7.9±0.3 (0.32)	13.8±0.4 (0.27)	14.1±1.7 (0.27)	43.7±2.7 (1.00)	11.1±0.6 (0.19)
1708	γ-terpineol ²	3.2±0.1 (0.13)	—	—	—	—	—
1712	borneol ²	28.0±2.7 (1.09)	28.9±2.0 (1.18)	195.9±2.9 (3.86)	56.7±8.3 (1.10)	31.1±1.9 (0.71)	12.3±0.4 (0.21)
1727	germacrene D ⁴	—	6.1±0.5 (0.17)	—	35.5±2.9 (0.69)	4.0±0.1 (0.09)	178.8±17.5 (3.04)
1736	β-bisabolene ⁴	—	—	93.9±2.7 (1.85)	38.5±2.8 (0.75)	4.0±0.2 (0.09)	139.6±15.0 (2.37)
1742	α-selinene ⁴	—	—	4.2±0.6 (0.08)	—	—	—
1746	α-citral ²	—	—	—	—	—	170.1±16.7 (2.89)
1752	Bicyclogermacrene ⁴	—	—	—	20.9±1.8 (0.41)	15.6±1.7 (0.36)	34.4±6.6 (0.58)
1754	carvone ²	—	—	—	11.3±0.8 (0.22)	10.2±0.6 (0.23)	—
1755	nerol acetate ⁸	—	—	—	—	—	92.2±7.9 (1.57)

2. pielikuma turpinājums

RI	Komponentu nosaukumi	Saturš, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
		C	LV	C	LV	C	LV
1760	carvone ²	—	—	7.5±0.1 (0.15)	—	—	—
1761	1-decanol ⁷	—	3.8±0.2 (0.15)	—	—	—	—
1770	δ-cadinene ⁴	—	3.8±0.1 (0.15)	25.5±0.2 (0.50)	6.5±0.2 (0.13)	6.0±0.1 (0.14)	22.9±1.8 (0.39)
1775	γ-cadinene ⁴	—	—	12.0±0.6 (0.24)	4.3±0.4 (0.08)	3.9±0.4 (0.09)	4.8±0.1 (0.08)
1782	trans-α-bisabolene ⁴	—	—	5.3±0.4 (0.10)	4.5±0.2 (0.09)	—	—
1782	β-sesquiphellandrene ⁴	—	—	—	—	—	7.8±0.3 (0.13)
1797	cubenene ⁴	—	—	3.5±0.1 (0.07)	—	—	—
1801	p-cumic aldehyde ⁷	—	—	4.4±0.1 (0.09)	—	—	—
1805	cis-geraniol ²	—	—	—	—	—	73.2±6.8 (1.24)
1808	α-cadinene ⁴	—	—	4.0±0.1 (0.08)	—	—	—
1823	geranyl propionate ⁸	—	5.9±0.1 (0.24)	—	—	—	—
1851	trans-geraniol ²	—	5.2±0.2 (0.21)	6.2±0.2 (0.12)	—	—	492.5±15.9 (8.37)
1856	p-cymen-8-ol ⁷	—	3.4±0.1 (0.14)	7.9±0.5 (0.16)	3.6±0.1 (0.07)	4.5±0.1 (0.10)	—
1861	thymyl acetate ⁸	—	3.7±0.1 (0.15)	7.0±0.4 (0.14)	—	—	—
1885	carvacryl acetate ⁸	—	—	10.1±0.2 (0.20)	49.5±4.6 (0.96)	3.8±0.9 (0.09)	5.8±0.2 (0.10)
1899	nerolidol ⁵	—	3.6±0.2 (0.15)	—	—	—	6.6±0.3 (0.11)
1890	epi-cubebol ⁵	—	—	3.3±0.1 (0.06)	3.4±0.0 (0.07)	—	—
1934	α-calacorene ⁴	—	—	4.1±0.1 (0.08)	—	—	—
1950	Cubebol ⁵	—	—	—	—	—	3.7±0.0 (0.06)
2010	caryophyllene oxide ⁵	9.2±0.6 (0.36)	12.8±0.6 (0.52)	23.0±0.1 (0.45)	11.2±0.5 (0.22)	7.9±0.5 (0.18)	51.7±5.3 (0.88)
2044	trans-nerolidol ⁵	—	—	—	—	—	109.6±7.8 (1.86)
2065	germacrene D-4-ol ⁵	3.2±0.3 (0.12)	3.6±0.1 (0.15)	—	—	—	30.8±2.6 (0.52)
2082	epi-cubebol ⁵	—	—	—	—	—	4.2±0.1 (0.07)
2093	Globulol ⁵	—	—	4.5±0.2 (0.09)	—	4.2±0.1 (0.09)	—
2101	viridiflorol ⁵	—	—	3.5±0.1 (0.07)	—	—	—
2106	p-cymen-7-ol ³	—	—	4.3±0.1 (0.08)	—	—	—
2118	Spathulenol ⁵	—	—	17.0±0.5 (0.34)	9.1±0.6 (0.18)	9.3±0.1 (0.21)	9.9±0.3 (0.17)
2143	thymol ³	684.2±36.9 (26.66)	677.6±36.3 (27.59)	867.3±18.1 (17.10)	72.6±5.9 (1.41)	43.9±2.7 (1.00)	220.3±13.7 (3.74)
2149	tau.-muurolol ⁵	—	—	—	—	—	10.8±0.8 (0.18)

2. pielikuma turpinājums

RI	Komponentu nosaukumi	Saturš, mg kg ⁻¹ ±SD, (%)					
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Thymus serpyllum</i>
		C	LV	C	LV	C	LV
2163	δ-cadinol ⁵	—	—	—	—	—	5.2±0.5 (0.09)
2183	carvacrol ³	78.9±6.2 (3.07)	34.7±2.2 (1.41)	1337.3±8.4 (26.37)	1826.0±69.1(35.54)	2334.4±46.1(53.34)	453.1±22.3 (7.70)
2219	α-cadinol ⁵	—	—	—	—	—	21.6±1.4 (0.37)
2311	caryophylladienol I ⁵	—	—	—	—	—	4.2±0.4 (0.07)
2316	caryophylladienol II ⁴	—	—	—	—	—	5.6±0.2 (0.10)

RI – aprēķinātais aiztures indekss (temperatūras programmētā hromatogrāfija) pret C9-C26n-alkāniem attiecībā uz OMegawax 250 kapilārās kolonnas. Gaistošo savienojumu koncentrācija tika izteikta, izmantojot iegūto kampara ārējā standarta kalibrēšanas līkni. % – dati iekavās iegūto gaistošo vielu procentuālā daļa no kopējās gaistošo savienojumu koncentrācijas. C – komerciālās ēteriskās eļļas, LV – laboratorijas apstākļos iegūtās ēteriskās eļļas no Latvijā ievāktiem augiem. Augšrakstā ¹⁻⁹ – savienojumu molekulārās klases: 1 – monoterpēna ogļūdeņraži, 2 – skābekli saturoši monoterpēni, 3 – aromātiskie monoterpēni, 4 – seskviterpēna ogļūdeņraži, 5 – skābekli saturoši seskviterpēni, 6 – alifātiskie aldehīdi un ketoni, 7 – alifātiskie spirti, 8 – esteri, 9 – citi.