



**Latvijas Lauksaimniecības universitāte**  
Veterinārmedicīnas fakultāte  
Klīniskais institūts

**Latvia University of Agriculture**  
Faculty of Veterinary Medicine  
Clinical institute

**Iveta Kociņa**

**IMUNOGLOBULĪNU A, G, M, LAKTOFERĪNA UN SOMATISKO ŠŪNU SKAITA  
DINAMIKA GOVJU PIENĀ SAISTĪBĀ AR SEZONĀLO TURĒŠANU  
UN PATOĢĒNO BAKTĒRIJU KLĀTBŪTNI TESMENĪ**

**IMMUNOGLOBULIN A, G, M, LACTOFERRIN AND SOMATIC CELL COUNT  
DYNAMICS IN COW MILK IN RELATION WITH COW SEASONAL KEEPING AND  
PATHOGENS PRESENCE IN MAMMARY GLAND**

Promocijas darba  
**KOPSAVILKUMS**  
Dr.med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai  
Veterinārmedicīnas nozarē

**SUMMARY**  
of doctoral thesis  
for scientific degree Dr.med.vet.

Jelgava 2011

**Promocijas darbs izstrādāts:**

- LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskajā institūtā.

**Research has been carried out at the:**

- Clinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Agriculture.

**Promocijas darba zinātniskā vadītāja:**

**Scientific supervisor:**

Dr.med.vet., asoc. profesore

**Vita Antāne**

**Oficiālie recenzenti:**

**Official reviewers:**

Dr.med.vet., asoc. profesors

**Edgars Liepiņš**

Dr.sc.ing., LLU BVZI „Sigra” vadošā pētniece

**Vita Šterna**

Dr.med.vet., docente

**Dace Bērziņa**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011.gada 12. septembrī plkst. 13.00  
LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K.Helmaņa ielā 8., pirmajā auditorijā

The defense of the thesis will take place at the Faculty of Veterinary Medicine LUA, Lecture Room 1,  
September 12, 2011, at 1 o'clock p.m.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes  
Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2,  
Jelgava and <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>

## SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS.....	5
Darba mērķis un uzdevumi.....	6
Darba zinātniskā novitāte .....	6
Pētījuma rezultātu aprobācija.....	7
MATERIĀLI UN METODEDES.....	8
Pētījuma veikšanas vieta un laiks .....	8
Pētījumā izmantotā ganāmpulka raksturojums.....	8
Promocijas darba kopējā shēma .....	8
Izmeklēšanas metodes, paraugu ņemšana .....	9
Datu statistiskā apstrāde .....	10
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	11
Govju tesmeņu funkcionālā stāvokļa izvērtējums, nosakot somatisko šūnu skaitu tesmeņu ceturkšņu pienā .....	11
Somatisko šūnu skaits pienā kūtsstāves un ganību periodos.....	12
Somatisko šūnu skaits pienā saistībā ar patogēniem ierosinātajiem tesmeņu ceturkšņos .....	12
Somatisko šūnu skaits pienā kūtsstāves un ganību periodos, saistībā ar patogēnajiem ierosinātajiem tesmeņu ceturkšņos.....	13
Imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un asins serumā .....	14
Imunoglobulīnu G, A, M koncentrācija pienā un asins serumā kūtsstāves un ganību periodos.....	16
Imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un asins serumā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību .....	18
Imunoglobulīnu G, A un M koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību .....	21
Laktoferīna vērtības pienā .....	23
Laktoferīna koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos .....	24
Laktoferīna koncentrācija pienā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību .....	24
Laktoferīna koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību .....	26
Korelācijas starp imunoglobulīnu G, A, M koncentrāciju pienā un asinīs, laktoferīna koncentrāciju un SŠS pienā .....	27
SECINĀJUMI .....	29
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES .....	30

## CONTENTS

INTRODUCTION .....	31
Objectives of the study .....	32
Scientific novelty of the study .....	32
Approbation of the research results .....	33
MATERIAL AND METHODS.....	34
Place and time of the study.....	34
Characterization of the herd used in the research.....	34
Schema of the research .....	34
Methods of examination and sampling.....	35
Statistical data processing.....	36
RESULTS AND DISCUSSION .....	37
Evaluation of the functional status of the cow udder by estimating somatic cell count in the udder quarter milk .....	37
Somatic cell count in milk during the housing and grazing period. ....	37
Somatic cell count in milk in relation with the pathogens presence in the udder quarter milk.....	38
Somatic cell count in milk during the housing and grazing period in relation with the pathogens presence in the quarter milk .....	38
Values of immunoglobulin G, A, M in the milk and blood serum .....	39
Concentration of immunoglobulin in the milk and blood serum during the housing and grazing period .....	40
Values of immunoglobulin G, A, M in the milk and blood serum in relation with the infection of udder quarters .....	41
Concentration of immunoglobulin in milk during the housing and grazing period in relation with the infection of udder quarters.....	43
Values of lactoferrin in milk .....	44
Concentration of lactoferrin in milk during the housing and grazing period .....	44
Concentration of lactoferrin in milk in relation with the infection of udder quarters.....	44
Concentration of lactoferrin in milk during the housing and grazing period in relation with the infection of udder quarters .....	45
Correlation between the immunoglobulin G, A, M concentration in milk and blood, the concentration of lactoferrin and SCC in milk .....	46
CONCLUSIONS .....	48
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES .....	49

## IEVADS

Ar mērķi sekmēt slaucamo govju noturību pret patogēno mikroorganismu ierosinātiem mastītiem, pētījumi imunoloģijā intensīvi tiek veikti jau gandrīz veselu gadsimtu. Tomēr vēl joprojām šai pētniecības virzienā sastopamas ievērojamas pretrunas un cerētie sasniegumi kavējas.

Ilgstošu laika periodu pastāvēja divu veidu viedokļi par imunoloģisko intervenci mastītu kontroles programmās. Pirmais izsaka pieņēmumu, ka mastīta kontrole un imunoloģisko aizsargreakciju veicināšana tesmenī iespējama uzlabojot menedžmenta pasākumus (Craven, Williams, 1985; Barkema et al., 1999), kā arī veicot mērķtiecīgu ģenētisko selekciju (Sanore, 2000). Otrs, atšķirīgs viedoklis - noteicošā loma mastītu kontrolē ir govju vakcinācijai (Watson, 1980; Kenny et al., 1992).

Dzīvnieka dabīgās aizsargreakcijas, ja tās nav nomāktā stāvoklī, var veiksmīgi ierobežot un likvidēt tesmeņa infekciju (Sandholm, Pyörälä, 1995). Ja imūnsistēmas aktivitāte ir pazemināta vai patogēno mikroorganismu virulence augsta, infekcija, daļēji likvidēta, var turpināties ilgāku periodu un parasti šis process izpaužas subklīniska vai hroniska mastīta formā (Ali-Vehmas, Sandholm 1995).

Pētījumi liecina, ka nozīmīga loma govju tesmeņa imunoloģiskajās aizsargreakcijās ir humorālās imunitātes komponentiem - imunoglobulīniem A, G, M un tesmeņa antibakteriālam faktoram - laktoferīnam (Kawai et al., 1999; Marnila, Korhonen, 2002; Hagiwara et al., 2003; Kuttila et al., 2003, Korhonen, Kaartinen, 2005). Diemžēl imunoglobulīnu un laktoferīna koncentrācija govju pienā laktācijas vidusposmā ir zema, tāpēc aktuāls ir jautājums, kā mastīta profilakses nolūkos, tesmenī stimulēt un uzturēt pietiekama daudzuma un spektra antivielas (Kenny et al., 1992), un pietiekami augstu laktoferīna koncentrāciju (Kai et al., 2002).

Publikācijās norādīts, ka imunoglobulīnu un laktoferīna koncentrācija govju pienā variē ne tikai atkarībā no tesmeņa inficētības, bet to ievērojami ietekmē arī govju vecums, laktācijas periods, govju turēšanas apstākļi un ēdināšana (Welty et al., 1976; Bishop et al., 1976; (Guidry et al., 1980(b); Guidry et al., 1980 (a)); Olson et al., 1981; Guidry, Miller, 1986; Butler, 1994; McFadden et al., 1997; Zagorska u.c., 2007).

Pēdējā gadu desmitā veikti pētījumi, lai noskaidrotu un izprastu imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna darbības intensificēšanas iespējas tesmenī. Pētījumos galvenokārt analizēti eksperimentāli izraisīti tesmeņu iekaisumi to akūtā stadijā, atsevišķos pētījumos vērtēta imunoglobulīnu un laktoferīna dinamika govju pienā subklīnisku tesmeņu infekciju gadījumos (Kawai et al., 1999; Hagiwara et al., 2003). Tomēr kopumā zinātnieki no dažādām pasaules valstīm izsaka samērā pretrunīgus viedokļus par imunoglobulīnu G, A un M un laktoferīna nozīmi tesmeņa funkcionālā stāvokļa un veselības saglabāšanā, kā arī atšķirīgi vērtē dažādu faktoru ietekmi uz minēto aizsargkomponentu aktivitāti tesmenī.

Jāsecina, ka pētījumos, izvērtējot imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna dinamiku govju pienā, netiek kompleksi ņemts vērā govju vecums, laktācijas posms, tesmeņa funkcionālais stāvoklis un veselība, kā arī govju turēšanas apstākļu un sezonas ietekme.

Ar nodomu izprast un izvērtēt imunoglobulīnu un laktoferīna lomu tesmeņa veselības saglabāšanā, šajā darbā pētīta imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna dinamika pienā kūtsstāves un ganību periods saistībā ar somatisko šūnu skaitu pienā un patogēno baktēriju klātbūtni tesmenī.

Latvijā šāda veida pētījums nav veikts, tomēr imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna daudzums govju pienā ir vērtēts, veicot bioloģiskajā un konvencionālajā lauksaimniecībā iegūtā piena ķīmiskā sastāva izpēti.

Apkopojot literatūrā esošās teorētiskās atziņas un spriedumus, kā arī zinātniskajos pētījumos iegūtos datus, izvirzīts promocijas darba mērķis.

### **Darba mērķis**

Izvērtēt imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna koncentrāciju un somatisko šūnu skaita dinamiku govju pienā saistībā ar govju sezonālo turēšanu un patogēno baktēriju klātbūtni tesmenī.

### **Darba uzdevumi**

1. Novērtēt ganāmpulka govju tesmeņa funkcionālo stāvokli, nosakot somatisko šūnu skaitu un patogēno baktēriju klātbūtni pienā kūststāves un ganību periodos.
2. Noteikt kā izmainās imunoglobulīnu A,G,M koncentrācija govju pienā un asins serumā saistībā ar govju sezonālo turēšanu un patogēno baktēriju klātbūtni tesmenī.
3. Analizēt laktoferīna koncentrāciju govju pienā kūststāves un ganību periodos, tesmeņa ceturskņos ar un bez patogēniem mastīta ierosinātājiem.
4. Noskaidrot iespējamās korelācijas starp imunoglobulīnu A,G, M, laktoferīna koncentrāciju un somatisko šūnu skaitu pienā.

### **Darba zinātniskā novitāte**

- Izanalizēts nosacīti laba ganāmpulka govju tesmeņa funkcionālais stāvoklis, izvērtēts, kā turēšanas apstākļu maiņa ietekmē govju tesmeņa dabīgo aizsargreakciju aktivitāti.
- Analizēta un studēta imunoglobulīnu A, G, M dinamika asinīs un pienā, kā arī laktoferīna un somatisko šūnu skaitu dinamika pienā, balstoties uz govju sezonālo turēšanu, proti, saistībā ar izmaiņām govju turēšanas apstākļos un ēdināšanā.
- Kompleksi izvērtēta imunoglobulīnu A, G, M koncentrācija asinīs un pienā, laktoferīna vērtība un somatisko šūnu skaits pienā atkarībā no patogēno baktēriju klātbūtnes tesmenī.
- Pētītas iespējamās sakarības starp imunoglobulīnu A, G un M daudzumu pienā, asinīs, laktoferīna koncentrāciju pienā un somatisko šūnu skaitu pienā.

**Darba apjoms:** promocijas darbs noformēts 118 lappusēs un sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījumu rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei un izmantotās literatūras saraksta un pielikuma.

## Pētījuma rezultātu aprobācija

### Pētījuma rezultāti aprobēti šādās zinātniskās konferencēs

1. 13<sup>th</sup> International Scientific conference „Production diseases in farm animals”. Leipzig, Germany, 29 July – 4 August 2007. *Seasonal variation of the lactoferrin concentration, somatic cell count and subclinical mastitis occurrence in cows.*
2. 11<sup>th</sup> International Scientific conference „Research for Rural Development”. Latvia, Jelgava, 19-21 May, 2005. *Immunoglobulins and Lactoferrin concentration in milk and bacteria causing subclinical mastitis in dairy cows.*
3. LLU VMF Starptautiskā zinātniskā konference „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna”. Jelgava, 2004. gada 15.oktobrī. *Laktoferīna koncentrācijas izmaiņas pienā govīm kūtsstāves un ganību periodā, tā saistība ar tesmeņa veselības rādītājiem.*
4. ESDAR and EVSSAR International Scientific conference „Reproduction in Domestic animals”, Ireland, August 2003. *Seasonal variation in Immune activity and accurance of Subclinical mastitis of cows.*
5. LLU VMF Starptautiskā zinātniskā konference „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna”. Jelgava, 2002. gada 14.novembrī. *Tesmeņa veselības rādītāju un imunoglobulīna satura izmaiņas pienā un asinīs, govīm pārejot uz ganību periodu.*
6. International conference of Animal Husbandry. Baisagola, October 2001. *How the welfare conditions affect milk quality to Latvian brown cows.*
7. LLU VMF Starptautiskā zinātniskā konference „Veterinārmedicīnas aktualitātes”. Jelgava, 2000. gada 29 septembrī. *Praktiskie novērojumi par somatisko šūnu skaita izmaiņām govju pienā.*

## MATERIĀLS UN METODES

### Pētījuma veikšanas vieta un laiks

Promocijas darbs izstrādāts laika periodā no 2002.gada līdz 2010.gadam, pētījuma eksperimentālā daļa veikta Valmieras rajona Ķoņu pagasta slaucamo govju novietnē „Pērles” 2002.gadā un 2003.gadā.

Rīgas Reprodukcijas Centra (RRC) laboratorijā noteikta laktoferīna koncentrācija pienā, imunoglobulīnu A, G, M koncentrācija pienā un asinīs, kā arī veikta asiņu morfoloģiskā un bioķīmiskā izmeklēšana.

Akciju sabiedrībā „Rīgas piena kombināts” piena kvalitātes laboratorijā noteikts somatisko šūnu skaitu pienā.

VMF Klīniskā institūta ganāmpulka veselības un reprodukcijas problēmu laboratorijā veikti piena mikrobioloģiskie izmeklējumi.

### Pētījumā izmantotā ganāmpulka raksturojums

Valmieras rajona Ķoņu pagasta slaucamo govju novietnē „Pērles” laika posmā no 2002.gada maijam līdz 2003.gada oktobrim bija 75 slaucamās govīs, ar vidējo izslaukumu 7156 kg gadā. Vidējais tauku saturs pienā ir 4.2%, olbaltums 3.3%, vidējais somatisko šūnu skaits pienā 255 000 šūnu mililitrā (tūkst.ml<sup>-1</sup>).

Ganāmpulku veido divdesmit četras Latvijas Brūnās šķirnes govīs, trīsdesmit divas Holšteinas Melnraibās šķirnes govīs, kā arī deviņpadsmit govīs, kas ir iepriekšminēto govju šķirņu hibrīdi. Ganāmpulka govju vecums ir no 2 līdz 8 gadi, bet vidējais laktāciju skaits – 3.5 laktācijas. Visas ganāmpulka govīs pakļautas pārraudzībai.

Govīs tiek turētas nesiltinātā, jeb atvieglota tipa mītnē, nepiesietas, grupētas un barotas diferencēti, atkarībā no to produktivitātes un laktācija perioda. Govju barības racionā iekļauts skābsiens, siens, spēkbarības maisījums, sakņaugi, kā arī barības piedevas. Kā pakaišu materiālu govju turēšanas telpā izmanto skujkoku skaidas. Vasaras – rudens periodā govīs atrodas dienas ganībās, turpretim ziemā un pavasarī tiek turētas mītnē.

Govīs slauc divas reizes dienā, slaukšanas zālē ar „skujiņas” tipa slaukšanas iekārtu, plkst. 6:00 un plkst.18:00. Pirms slaukšanas govju pupus tīra ar vienreizējās lietošanas salvetēm un katra ceturkšņa pirmās piena strūklas ieslauc krūzītē ar melnu pamatni un izvērtē piena kvalitāti. Katru reizi pēc govju izslaukšanas notiek pupu dezinfekcija. Tā kā slaukšanas zālē vienlaicīgi slauc četras govīs, slaucējam ir iespēja sistemātiski sekot līdzi katras govīs slaukšanas procesam.

### Promocijas darba kopējā shēma

2002.gadā un 2003.gadā kopā četras reizes noņēmām un izmeklējām piena un asins paraugus 16 govīm, kuras izvēlējamies kā ganāmpulka govju pārstāvošu paraugkopu un iekļāvām izmeklējumu grupā. Govīs pētījumam - paraugu noņemšanai un analizēšanai izvēlētas ar mērķi:

- analizēt pienu, kas iegūts govju laktācijas vidusposmā un no klīniski veselīgiem tesmeņu ceturkšņiem,
- analizēt līdzīga vecuma (2,3 laktācija) un produktivitātes (22-25kg piena dienā) govju piena un asins paraugus,
- analizēt paraugus no visām ganāmpulkā esošām govju šķirnēm, lai iegūtu kopainu par ganāmpulka govju tesmeņu funkcionālo (veselības) stāvokli, un pētāmo tesmeņa aizsargkomponentu aktivitāti. Tādējādi pētījuma grupā iekļautas piecas Latvijas Brūnās šķirnes govīs, septiņas Holšteinas Melnraibās šķirnes govīs, kā arī četras Latvijas Brūnās un Holšteinas Melnraibās govju šķirņu krustojumu govīs.



Visām izmeklējuma grupā iekļautajām govīm, divas reizes izmeklējumi veikti ganību periodā un divas reizes kūtsstāves periodā.

Piena un asins paraugus noņēmām katrai pētījuma grupā iekļautai govij, katrā izmeklējumu veikšanas reizē. Piena paraugus ņēmām no tesmeņa katra ceturkšņa. Sākotnēji no visiem ceturkšņiem iegūtos piena paraugus pārbaudījām ar Kalifornijas mastītu testu (KMT).

Ceturkšņu piena paraugus, kuros KMT rezultāts uzrādīja infekcijas „pēdas” (1), aizdomīgu (2) vai pozitīvu (3) reakciju izmeklējām mikrobioloģiski. Turklāt mikrobioloģiski izmeklējām arī visu ceturkšņu piena paraugus tām govīm, kurām kaut viena ceturkšņa piena paraugā KMT rezultāts uzrādīja aizdomīgu (2) vai pozitīvu (3) reakciju.

Tādējādi kopumā mikrobioloģiski tika izmeklēti 111 piena paraugi.

Veicot somatisko šūnu skaita, imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna dinamikas izpēti pienā saistībā ar govju sezonālo turēšanu, tika analizēti 214 piena paraugi, savukārt izvērtējot somatisko šūnu skaitu, imunoglobulīnu A, G, M un laktoferīna koncentrāciju pienā atkarībā no govju tesmeņa inficētības, tika analizēti 111 bakterioloģiski izmeklētie piena paraugi.

### **Izmeklēšanas metodes, paraugu noņemšana**

#### **Morfoloģiskā un bioķīmiskā asins paraugu izmeklēšana**

Asins morfoloģisko un bioķīmisko analīžu rezultāti izvērtēti, lai pārliecinātos, ka izmeklējuma grupā iekļautās govīs ir veselās.

Asins paraugu morfoloģiskie izmeklējumi (eritrocītu vidējais lielums, hemoglobīnu koncentrācija, trombocītu, leikocītu, limfocītu, monocītu skaits, fagocitārais indekss, hematokrīta indekss) un bioķīmiskie izmeklējumi (kopējais proteīns, globulīni, urīnviela, glikoze, kreatīns, Ca, P daudzums, transferīns u.c.) veikti „Rīgas Reproprodukcijas Centra laboratorijā”. Asins paraugu izmeklēšanai izmantots automātiskais analizators MS-4 (Melet Schloesing Laboratories, Pontoise, France). Asins paraugi ņemti no astes vēnas sterilos, vienreizējas lietošanas vakutaineros.

#### **Tesmeņu klīniskā izmeklēšana un piena paraugu novērtēšana**

Lai pārbaudītu un noteiktu tesmeņa veselības stāvokli, visām pētījumā iekļautām govīm tesmeni un pupus novērtējām vizuāli un palpējām gan pirms, gan pēc izslaukšanas. Tesmeņa klīnisko izmeklēšanu veicām saskaņā ar IDF noteiktajiem kritērijiem (International Dairy Federation, 1987).

Pirms govju slaukšanas no katra ceturkšņa pupa pirmās piena strūklas ieslaucām krūzītē ar tumšu pamatni un veicām pirmo piena strūklu fizikālo novērtēšanu. Vizuāli izvērtējām piena krāsu, smaržu un konsistenci. Īpašu vērību vērām uz piena pārslu, recekļu, stīgu esamību. Piena paraugu novērtēšanu veicām pēc M.Sandholma un S. Pyörälä, aprakstītās metodes (Sandholm, Pyörälä 1995).

#### **Kalifornijas mastīta testa veikšana**

Tālākā izmeklēšanā govju subklīnisko mastītu noteikšanai pielietojām netiešo šūnu skaitīšanas metodi Kalifornijas mastīta testu (KMT). Tests pamatojas uz tūlītēju somatisko šūnu skaita novērtēšanu pienā. Reakciju vērtējām pēc Philpot, Nickerson (1997) aprakstītās metodes, nosakot gēla veidošanās intensitāti plātes iedobēs.

#### **Piena paraugu mikrobioloģiskā izmeklēšana**

Piena paraugus laboratoriskai izmeklēšanai aseptiski noņēmām pēc ISO 707<sup>(1)</sup> standartā rekomendētās metodes.

Piena paraugi ņemti laikā pirms rīta slaukšanas un uz laboratoriju nogādāti termosomā, kurā temperatūra nepārsniedz + 10° C. Piena mikrobioloģiskie izmeklējumi patogēno mikroorganismu identificēšanai veikti tūlīt pēc paraugu piegādes.

Standartprocedūras patogēno mikroorganismu identificēšanai pienā veiktas saskaņā ar IDF (1981) noteiktajiem kritērijiem, un Quinn et al. (2000) aprakstīto procedūru.

Mikroorganismu sugu identifikācijai agara barotnē tika uzsētas kolonijas. Izolēto mikroorganismu kultūru bioķīmisko identifikāciju veicām, izmantojot: Krāsošanu pēc Grama, Oksidāzes testu, Katalāzes testu un Koagulāzes testu.

### **Somatisko šūnu skaita noteikšana pienā**

**Somatisko šūnu skaitu** noteicām A/S „Rīgas piena kombināts” piena kvalitātes laboratorijā, saskaņā ar LVS EN ISO 13366-3:1997 "Piens. Somatisko šūnu skaita noteikšana", Fluora-opto-elektroniskā metode", kurā tiek izmantota iekārta "Somacount 300".

Tiešais Somacount mērījumu nolasījums ir somatiskās šūnas tūkstošos vienā mililitrā (ml<sup>-1</sup>) piena. Šūnu skaitļošanas instruments darbojas pēc optiskās fluorescences principa.

Tā kā SŠS pienā govīm svārstās no dažiem simtiem līdz vairāk kā četriem miljoniem šūnu mililitrā, tad aprēķinos, lai veidotu uzskatāmākus grafikus, lietotas naturālās logaritmiskās vērtības ln(somat), savukārt teksta daļā un diskusijā izmantots laboratoriski noteiktais somatisko šūnu skaits pienā.

### **Laktoferīna un imunoglobulīnu koncentrācijas noteikšana**

**Laktoferīna koncentrācijas noteikšanai pienā** tika izmantots reaģentu komplektu D-4156 „Laktoferin – IFA - BEST”, sērijas Nr. 33, kvalitātes standarts TY 9398-045-23548172-2001.

Reaģentu komplekts izgatavots un pielietojams laktoferīna kvantitatīvai noteikšanai asins serumā un citos bioloģiskos šķīdumos – asins plazmā, urīnā, siekalās, spermā, pienā u.c., izgatavots a/s „Vektor-Best”, Krievijas Federācijā. Metode pamatojas uz cietās fāzes imūnfermentanalīzi, izmantojot poliklonālās laktoferīna antivielas.

**Imunoglobulīnu G, A un M koncentrācijas noteikšanai pienā un asinīs** tika izmantoti reaģentu komplekti „MIKROANALIZ IgG”, sērijas Nr.11, kvalitātes standarts TY 9398-337-00155866-99, „MIKROANALIZ IgA”, sērijas Nr.11, kvalitātes standarts TY 9398-335-00155866-99, „MIKROANALIZ IgM”, sērijas Nr.11, kvalitātes standarts TY 9398-336-00155866-99.

Reaģentu komplekti izgatavoti un pielietojami imunoglobulīnu G, A, M kvantitatīvai noteikšanai ar turbidimetrijas metodi asins serumā un citos bioloģiskos šķīdumos – asins plazmā, urīnā, siekalās, spermā, pienā u.c., izgatavoti a/s „НПО СИНЕКОЗ”, Krievijas Federācijā.

### **Datu statistiskā apstrāde**

Pētījuma datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot SPSS programmu -11.0 versiju (Statistical Package for Social Science) un Microsoft Excel paketes.

Datu statistiskā apstrāde - aprēķināti vidējie rādītāji, standartnovirze  $\bar{x}(s)$ , minimālās, maksimālās vērtības. Aprakstošās statistikas rādītāji – vidējā vērtība, standartnovirze, minimālā un maksimālā vērtība, aprēķināta ar SPSS datu analīzes rīku Descriptive Statistic.

Darbā izvirzītās hipotēzes pārbaudītas ar p-vērtības metodi, aprēķinātā p-vērtība salīdzināta ar būtiskuma līmeni  $\alpha=0,05$  (Arhipova, Bāliņa, 2003).

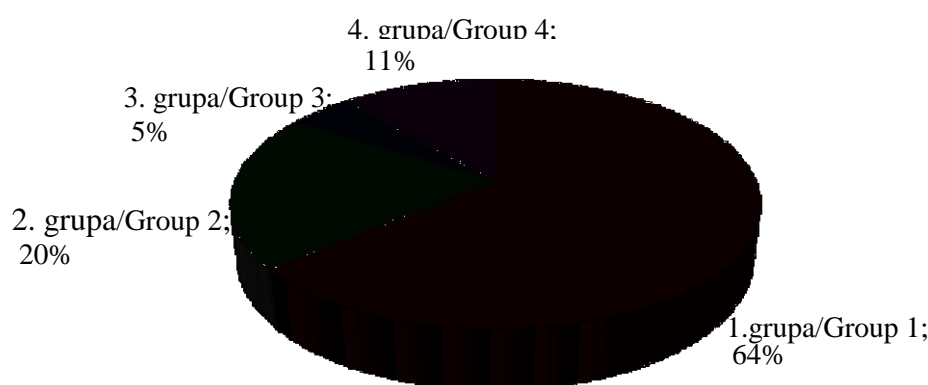
Kvalitatīvo faktoru ietekmes novērtēšanai lietota vienfaktoru dispersijas analīze, savukārt faktoru mijiedarbības efekta izpētei izmanta divfaktoru dispersijas analīzi. Pētāmā faktora būtiskums noskaidrots, pārbaudot  $H_0$  un  $H_1$  hipotēzes (Arhipova, Bāliņa, 2003).

## PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### Govju tesmeņu funkcionālā stāvokļa izvērtējums, nosakot somatisko šūnu skaitu tesmeņu ceturkšņu pienā

Plaši tiek pētītas, izstrādātas un salīdzinātas dažādas metodes piena dziedzera slimību agrīnai diagnostikai un izvērtēšanai, tomēr joprojām vispāratzīts tesmeņa veselības indikators ir somatisko šūnu skaits (SŠS) pienā. Tāpēc arī mēs, savā pētījumā somatisko šūnu skaitu pienā izmantojām kā indikatoru tesmeņa funkcionālā stāvokļa un veselības izvērtēšanai.

Izvērtējot somatisko šūnu skaita rādītājus tesmeņu ceturkšņu pienā, ceturkšņus iedalījām četrās grupās (1.attēls):



**1.att. Tesmeņu ceturkšņu sadalījums (%) , pamatojoties uz somatisko šūnu skaitu pienā**  
**Fig. 1. Division of the udder quarters (%) based on somatic cell count in milk**

**1.grupa:** ceturkšņi, kuru pienā SŠS nepārsniedz  $100\,000\text{ ml}^{-1}$ . Šis rādītājs saskaņā ar IDF definīciju liecina, ka ceturkšņi ir veseli;

**2.grupa:** ceturkšņi, kuru pienā SŠS ir robežās no  $100\,000\text{ ml}^{-1}$  līdz  $300\,000\text{ ml}^{-1}$ , kas pēc IDF definīcijas klasificējami, kā iespējami inficēti ceturkšņi;

**3.grupa:** ceturkšņi, kuru pienā SŠS ir robežās no  $300\,000\text{ ml}^{-1}$  līdz  $500\,000\text{ ml}^{-1}$ . Šis rezultāts saskaņā ar IDF definīciju norāda uz latentu vai subklīniski inficētu ceturkšņi;

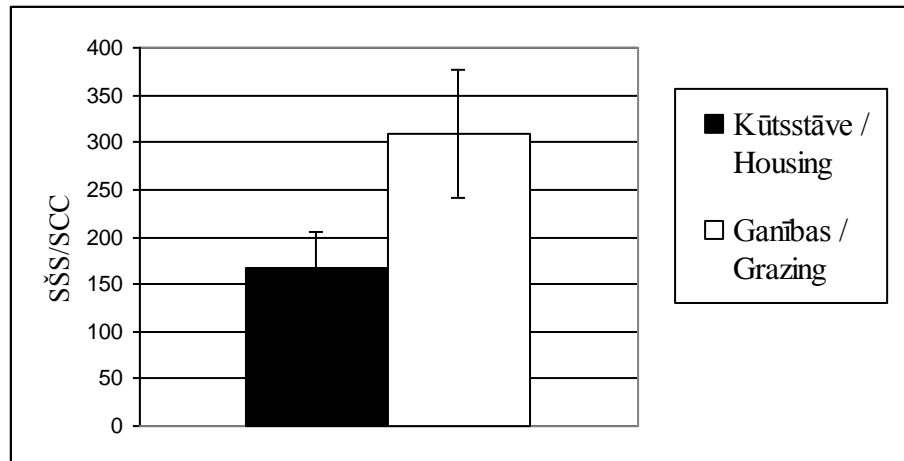
**4.grupa:** ceturkšņi, kuru pienā SŠS pārsniedz  $500\,000\text{ ml}^{-1}$ , kas saskaņā ar IDF definīciju liecina par subklīnisku vai klīnisku mastītu.

Procentuāli lielākā daļa, jeb 64% no visu izmeklēto govju tesmeņu ceturkšņiem ir pilnībā veseli, SŠS šo ceturkšņu pienā nepārsniedz  $100\,000\text{ ml}^{-1}$ . Savukārt 20% ceturkšņu klasificējami kā iespējami inficēti, SŠS pienā ir robežās no  $100\,000\text{ ml}^{-1}$  līdz  $300\,000\text{ ml}^{-1}$ . Latenti vai subklīniski inficēti ir 5% ceturkšņu, SŠS pienā no  $300\,000\text{ ml}^{-1}$  līdz  $500\,000\text{ ml}^{-1}$ , bet 11% ceturkšņi ir subklīniska vai klīniska mastīta skarti, jo SŠS pienā pārsniedz  $500\,000\text{ ml}^{-1}$ .

Kopumā 84% tesmeņa ceturkšņu ražo pienu, kurā SŠS nepārsniedz  $300\,000\text{ ml}^{-1}$ , un šāds koppiens saskaņā ar Ministru kabineta 2010. gada 9. februāra noteikumiem Nr. 123 "Veterinārās, higiēnas un nekaitīguma prasības svaigpiena aprītei" pēc kvalitātes standartiem atbilst augstākās kategorijas pienam.

## Somatisko šūnu skaits pienā kūtsstāves un ganību periodos

Pētījuma gaitā veicām somatisko šūnu skaita salīdzinošu izvērtēšanu pienā kūtsstāves un ganību periodos. Iegūtie rezultāti (2.attēls) liecina, ka vidējais SŠS analizētajos piena paraugos ir 233 710 (566.31) ml<sup>-1</sup>, kūtsstāves periodā tas ir 169 530 (419.94) ml<sup>-1</sup>, savukārt ganību periodā somatisko šūnu skaits pienā ir ievērojami augstāks 302 880 (685.72) ml<sup>-1</sup>. SŠS pienā būtiski (p<0.05) atšķiras ganību un kūtsstāves periodos.



**2.att. Somatisko šūnu skaits pienā (tūkst/ml) kūtsstāves un ganību periodā**  
**Fig. 2. Somatic cell count in milk (thousand/ml) in the housing and grazing period**

Arī mūsu iepriekš veikto pētījumu rezultāti liecina, ka somatisko šūnu skaits govju pienā ganību periodā ir būtiski augstāks, salīdzinot ar kūtsstāves periodu (Kociņa, Antāne, 2000).

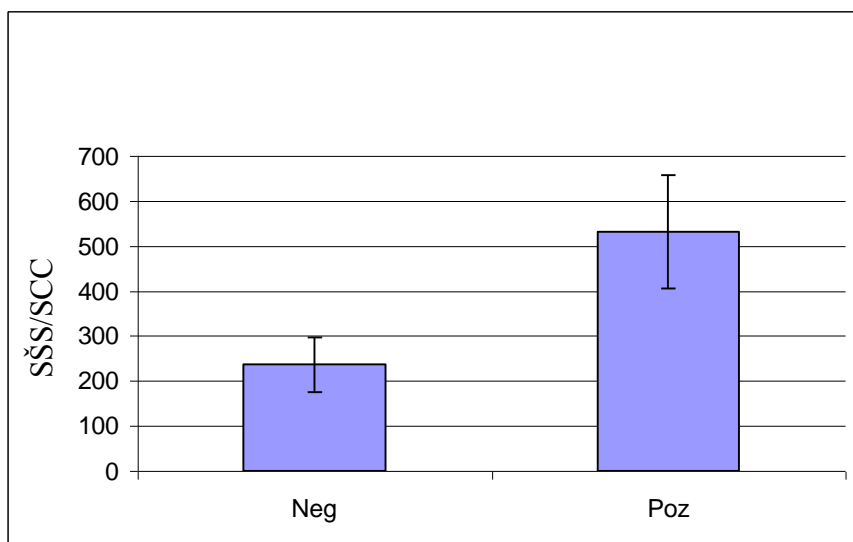
Ļoti iespējams, šo pieaugumu veicina intensīva ārējās vides faktoru ietekme, radot tesmeņa kairinājumu, kā arī dzīvnieku imūnreakciju aktivācija ganību periodā. Publikācijās minēts, ka liellopiem karstuma un stresa ietekmē pieaug leikocītu migrācija piena dziedzerī (Elvinger et al., 1992) un palielinās SŠS pienā (Johnson, Vanjonack 1975). Demelash (2005) ziņo, ka sezona būtiski ietekmē somatisko šūnu skaitu pienā, proti, ganību periodā, siltā un mitrā laikā govīm ir lielāks risks saslimt ar tesmeņa iekaisumu. Iespējamais skaidrojums lielākam mastītu izcelsmes riskam ganību periodā ir tesmeņa kontakts ar ārējās vides kairinātājiem, t.sk. patogēniem mikroorganismiem (Goldberg et al., 1992).

Westgarth (1975) un Demelash (2005) norāda, ka SŠS govju pienā mēdz būt ļoti mainīgs, pat paaugstināts ganāmpulkos, kur govju pienā nav konstatēta patogēno ierosinātāju klātbūtne.

Lai noskaidrotu kā patogēnie mikroorganismi ietekmē SŠS govju pienā un izvērtētu to lomu subklīnisku mastītu izcelsmē, veicām ceturkšņu piena mikrobioloģisku izmeklēšanu.

### Somatisko šūnu skaits pienā saistībā ar patogēnajiem ierosinātājiem tesmeņu ceturkšņos

Iegūtie rezultāti (3.attēls) liecina, ka visaugstākais vidējais SŠS ir to ceturkšņu piena paraugos, kuros identificēti patogēnie mastītu ierosinātāji, un tas ir būtiski augstāks (p<0.001), kā paraugos bez patogēniem ierosinātājiem, attiecīgi 540 050 ml<sup>-1</sup> (802.18) un 247 800 (535.80) ml<sup>-1</sup>. Tas apstiprina apgalvojumu, ka nozīmīgs SŠS pieauguma cēlonis pienā ir tesmeņa infekcija (Philpot, Nickerson, 1997; Burveinich et al., 1998; Hamann, 2002).



**3.att. Somatisko šūnu skaits (tūkst/ml) pienā ar (Poz) un bez (Neg) patogēniem ierosinātājiem**  
**Fig. 3. Somatic cell count (thousand/ml) in milk with (Poz) and without (Neg) pathogenic agents**

Piena paraugu mikrobioloģiskās izmeklēšanas rezultāti norāda, ka visbiežāk inficēti ir tesmeņa pakalējie ceturkšņi (67.7%), savukārt, augstāks SŠS gan kūtsstāves, gan ganību periodā, novērots tesmeņa labās daivas ceturkšņos. Tas norāda, ka somatisko šūnu skaita pieaugums pienā govīm laktācijas visusposmā, ne vienmēr saistāms ar patogēno ierosinātāju klātbūtni tesmenī (Johnson, Vanjonack 1975; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995).

Kā norādīts pētījumos, tesmeņa infekcijas izplatības intensitāte ir tieši atkarīga no mikroorganismu sugām, kas sastopamas vidē, kurā uzturas govīs. To, cik ganāmpulka govju infekcija skars, nosaka divi galvenie faktori: mikroorganismu virulence un govju individuālās spējas pretoties infekcijai (Reneau, 1986; Ali-Vehmas, Sandholm, 1995).

Identificējot patogēnos mikroorganismus, secinām, ka 52.9% ceturkšņu piena paraugos atklāts *KNS*, 26.5% paraugos *Str. uberis*, un 20.6% paraugos *S.aureus*.

*Str.uberis* inficēto ceturkšņu pienā novērojām visaugstāko vidējo somatisko šūnu skaitu 779 880 (1117.53) ml<sup>-1</sup>. *S.aureus* infekcijas gadījumā vidējais SŠS ir 566 420 (480.88) ml<sup>-1</sup>, bet *KNS* infekcijas gadījumā SŠS pienā ir 409 880 (728.78) ml<sup>-1</sup>. Pētījuma rezultāti liecina, ka SŠS pienā būtiski ( $p < 0.001$ ) atšķiras atkarībā no tesmeņu ceturkšņos esošajiem patogēniem ierosinātājiem.

### **Somatisko šūnu skaits pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar patogēnajiem ierosinātājiem tesmeņu ceturkšņos**

Lai izanalizētu somatisko šūnu skaita svārstības pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar patogēno baktēriju klātbūtni tesmeņa ceturkšņos, izvērtējam govju sezonālo turēšanu un patogēnos mastīta ierosinātājus, kā saistītus faktoros (1.tabula).

Pētījuma rezultāti liecina, ka govju sezonālās turēšanas mijiedarbība ar patogēnajiem mastīta ierosinātājiem būtiski ( $p < 0.05$ ) ietekmē somatisko šūnu skaitu pienā.

**Somatisko šūnu skaits pienā kūtsstāves un ganību periodos, saistībā ar tesmeņu ceturkšņos identificētajiem patogēnajiem ierosinātajiem**

**Somatic cell count in milk during the housing and grazing period in relation with the pathogenic agents identified in the udder quarters**

Ceturkšņu piens/ Quarter milk	Kūtsstāves periods/Housing period			Ganību periods/ Grazing period		
	Paraugu skaits/ Number of samples	SŠS tūkst.ml <sup>-1</sup> / SCC thousand/ml <sup>-1</sup>	Standartnovirze/ Standard deviation	Paraugu skaits/ Number of samples	SŠS tūkst.ml <sup>-1</sup> / SCC thousand/ml <sup>-1</sup>	Standartnovirze/ Standard deviation
Bez patogēniem/ Without pathogens	34	<u>121.46</u>	240.33	35	<b><u>358.34</u></b>	701.71
<i>KNS</i>	11	581.22	101.46	11	238.55	181.99
<i>Str.uberis</i>	7	375.00	812.52	4	<b>2197.00</b>	930.55
<i>S.aureus</i>	5	<b>817.00</b>	402.46	4	232.33	397.22

**Kūtsstāves periodā** visaugstākais vidējais SŠS **817 000** (402.46) ml<sup>-1</sup> konstatēts *S.aureus* inficēto ceturkšņu pienā. Publikācijā minēts, ka visvairāk *S. aureus* izolēts no piena paraugiem ziemas un rudens periodā (Konošonoka, 2005). Ir norādes, ka *S.aureus* ir tipisks hronisko mastītu izraisošs mikroorganisms un inficēšanās risks ar to īpaši pieaug, samazinoties dzīvnieka rezistencei (Ali-Vehmas, Sandholm, 1995). Mūsu iegūtie rezultāti iespējams liecina, ka kūtsstāves periodā *S.aureus* aktivitāte pieaug, jo pazeminās govju rezistence.

**Ganību periodā** visaugstāko vidējo SŠS **2 197 000** (930.55) ml<sup>-1</sup> novērojam *Str.uberis* inficēto ceturkšņu pienā, turpretim kūtsstāves periodā šīs infekcijas gadījumā SŠS pienā ir tikai 375 00 (812.52) ml<sup>-1</sup>. *Str.uberis* ir vides mikroorganisms, kas nespēj ilgstoši uzturēties tesmenī (Philpot, Nickerson, 1997). Tas ļauj izdarīt pieņēmumu, ka pētāmajā ganāmpulkā, nopietnākais infekcijas avots ir ganību vide. Izpētīts, ka *Str.uberis* ne vienmēr izraisa akūtas slimības pazīmes un infekciju iespējams sekmīgi ierobežot, uzlabojot govju turēšanas un vides higiēnas apstākļus (Philpot, Nickerson, 1997).

Publikācijās minēts, ka tesmeņa iekaisuma gadījumā SŠS pienā norāda uz mastīta smaguma pakāpi (Bramley, 1991). Iespējams, ka ganību periodā atsevišķu patogēno mikroorganismu sugu virulence ir augstāka, turklāt, ganību periodā intensificējoties govju dabīgajām aizsargspējām, arī tesmeņa imunoloģiskās aizsargreakcijas izpaužas spēcīgāk.

Mūsu iegūtie rezultāti norāda, ka **ganību periodā**, salīdzinot ar kūtsstāves periodu, somātisko šūnu skaits ir būtiski augstāks ( $p < 0.01$ ) arī piena paraugos **bez patogēnām baktērijām**, attiecīgi 358 340 (701.71) ml<sup>-1</sup> un 121 460 (240.33) ml<sup>-1</sup>. Iespējams, tas apstiprina viedokli par tesmeņa neinfekciozu kairinājumu, kā nozīmīgu SŠS pieauguma cēloni govju pienā (Ligers, 1971; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995; Kociņa, Antāne, 2000; Demelash et.al. 2005). Tomēr pastāv liels risks, ka tesmeņa audu kairinājumu var komplicēt tesmeņa infekcija (Johnson, Vanjonack 1975; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995; Ali-Vehmas, Sandholm, 1995).

#### **Imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un asins serumā**

Pētot un analizējot imunoglobulīnu vērtības govju pienā un asins serumā, secinām, ka autori pārsvarā uzmanību akcentē vai nu uz patogēno mikroorganismu lomu vai laktācijas perioda nozīmi imunoglobulīnu koncentrācijas izmaiņās (Guidry et al., 1980 (a); Guidry et al., 1980 (b); Butler,

1983; Doymaz et al., 1988; Korhonen, Kaartinen, 1995; Korhonen et al, 2000), bet neizvērtē šo bioloģiski aktīvo vielu dinamiku plašākās kopsakarībās.

Zināms, ka imunoglobulīnu A, G un M daudzums pienā ievērojami variē atsevišķu indivīdu starpā (Guidry & Miller, 1986), un visi to koncentrāciju ietekmējošie faktori nemaz vēl nav apzināti (Deptula, 1987; Butler, 1994; Korhonen et al., 2000, Krol, 2010). Kā norādīts literatūrā, veselu govju pienā laktācijas vidusposmā visu klašu imunoglobulīnu koncentrācija ir zema, bet tā pieaug tesmeņa iekaisuma laikā (Sandholm, Korhonen, 1995; Korhonen et al., 2000).

Mūsu iegūtās imunoglobulīnu G, A un M vērtības pienā, kā arī un literatūrā sniegtās normas apkopotas 2.tabulā.

2.tabula/Table 2

**Mūsu iegūtās imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un literatūrā sniegtās normas  
Immunoglobulin G, A, M values in milk obtained in the present research and  
standards given in literature**

Imunoglobulīnu klase/ Class of immunoglobulins	Mūsu pētījuma dati/ Data of our studies		Norma veselām govīm/ Standard in healthy cows	Informācijas avots/ Information source
	vidējā vērtība, standartnovirze/ Mean value, stand. deviation	vērtību svārstības/ Ranges of values		
<b>IgG</b>	2.05 (0.83) $gl^{-1}$	0.16 - 4.30 $gl^{-1}$	0.70 $gl^{-1}$ - 1.40 $gl^{-1}$	Sandholm, Korhonen, 1995; Lui et al., 2009
<b>IgA</b>	1.36 (0.67) $gl^{-1}$	0.48 - 4.95 $gl^{-1}$	0.12 $gl^{-1}$ - 1.12 $gl^{-1}$	Sandholm, Korhonen, 1995; Zagorska u.c., 2007
<b>IgM</b>	1.33 (0.94) $gl^{-1}$	0.00 - 6.17 $gl^{-1}$	0.10 $gl^{-1}$ - 1.65 $gl^{-1}$	Sandholm, Korhonen, 1995; Zagorska u.c., 2007

Salīdzinot ar citu autoru norādītajām imunoglobulīnu A, G, M normām veselu govju **pienā**, mūsu pētījumā:

**IgG** koncentrācija ir augstāka;

**IgA** un **IgM** koncentrācija augstāka, bet sakrīt ar cita, Latvijā veikta pētījuma rezultātiem (Zagorska, 2007).

Visu pētāmo klašu imunoglobulīnu vērtības pienā, jo īpaši IgM, svārstās plašās robežās.

Turpretim **asins serumā IgG** un **IgM** vidējās vērtības, attiecīgi 2.34 (0.91)  $gl^{-1}$  un 0.53 (0.52)  $gl^{-1}$ , ir zemākas, salīdzinot ar citu autoru norādītajām normām, savukārt **IgA** koncentrācija nedaudz pārsniedz literatūrā norādītās normas (Butler, 1994);

Iegūtie rezultāti iespējams norāda, ka latentā un subklīniskā tesmeņa iekaisuma gadījumā, notiek imunoglobulīnu G un M pastiprināta ieceļošana no asinsrites tesmeņa audos, lai pasargātu tesmeni no infekcijas manifestācijas (Lascelles, 1979). Tādējādi palielinās imunoglobulīnu G, A un M koncentrācija pienā, bet samazinās to daudzums asins serumā. Savukārt asins serumā imunoglobulīnu G un M koncentrācijas pieaugumu nenovēro, jo govīm nav akūtas formas tesmeņa iekaisumu (Rainard, Caffin, 1983). Iespējama arī virkne citu piena-asins barjeras regulējošu un ietekmējošu faktoru iedarbība, kas nosaka imunoglobulīnu ieceļošanas intensitāti no asinsrites piena dziedzera audos (Lewis-Jones et al., 1985).

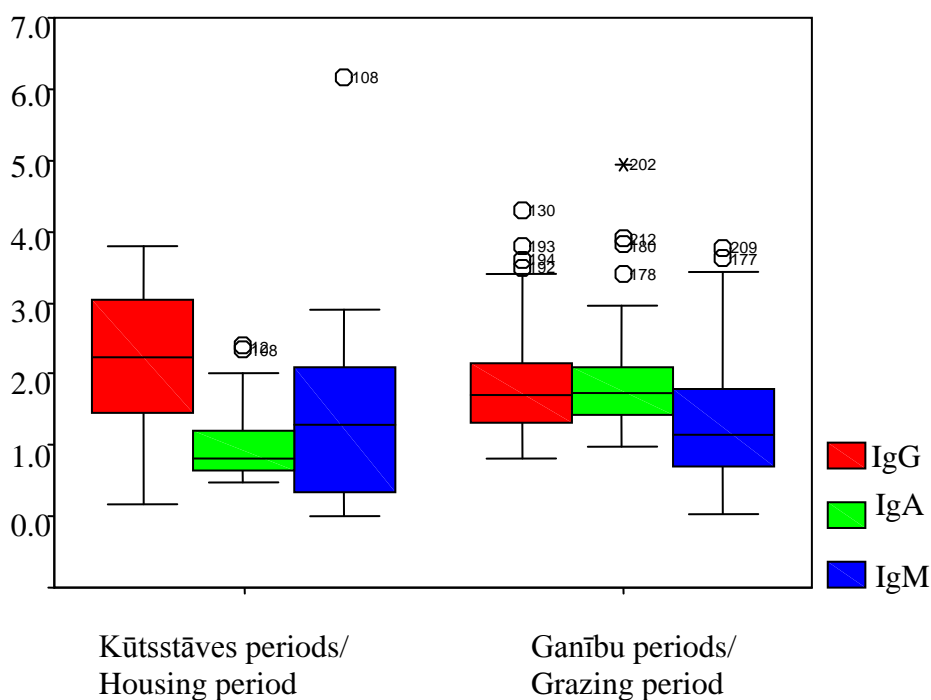
Mūsu iegūtā IgA koncentrācija asins serumā atbilst literatūrā sniegtajām vērtībām, kas iespējams liecina, tesmeņa audu aizsardzībai nepieciešamais IgA, atšķirībā no IgG un IgM, pamatā ir vietējo, plazmatisko šūnu producēts, nevis ieeļo no asinsrites (Watson, Lascelles, 1973; Watson, 1980; Guidry et al., 1980(b)).

#### Imunoglobulīnu G, A, M koncentrācija pienā un asins serumā kūtsstāves un ganību periodos

Publikācijās minēts, ka liellopiem imunoglobulīnu daudzums **asins serumā un pienā** nozīmīgi variē atkarībā no sezonas un vislielāko koncentrāciju pienā tas sasniedz pavasarī un vasarā (Guidry & Miller, 1986; Conesa et al., 2005; Konuspaveva, 2007).

Arī mūsu pētījums pierāda, ka govju sezonālā turēšana būtiski ietekmē imunoglobulīnu G un A koncentrāciju pienā un imunoglobulīnu G, A un M koncentrāciju asins serumā, un šo imunoglobulīnu vērtības būtiski atšķiras ( $p < 0.001$ ) kūtsstāves un ganību periodos.

4. attēls uzskatāmi parāda imunoglobulīnu G, A un M vērtības pienā kūtsstāves un ganību periodā, kā arī šo vērtību izkliedi.



**4.att. Imunoglobulīnu G, A un M daudzums pienā ( $g l^{-1}$ ) kūtsstāves un ganību periodos**  
**Fig 4. Immunoglobulin G, A, and M amount in milk ( $g l^{-1}$ ) in the housing and grazing period**

**Imunoglobulīns G** pienā visaugstāko vidējo vērtību  $2.26 (0.91) g l^{-1}$  sasniedz kūtsstāves periodā, kad tas ir dominējošais globulīns govju pienā. Ganību periodā vidējā IgG vērtība piena paraugos ir  $1.83 (0.67) g l^{-1}$  un tā kvantitatīvais pārsvars par citiem imunoglobulīniem pienā ir neliels. **Imunoglobulīns A** pienā visaugstāko vidējo vērtību  $1.83 (0.61) g l^{-1}$  sasniedz **ganību periodā**, turpretim kūtsstāves periodā IgA vidējā vērtība pienā ir divas reizes zemāka, proti,  $0.93 (0.37) g l^{-1}$ . **Imunoglobulīna M** pienā vidējās vērtības ganību un kūtsstāves periodos ir aptuveni vienādas, attiecīgi  $1.35 (0.88) g l^{-1}$  un  $1.31 (1.00) g l^{-1}$ .



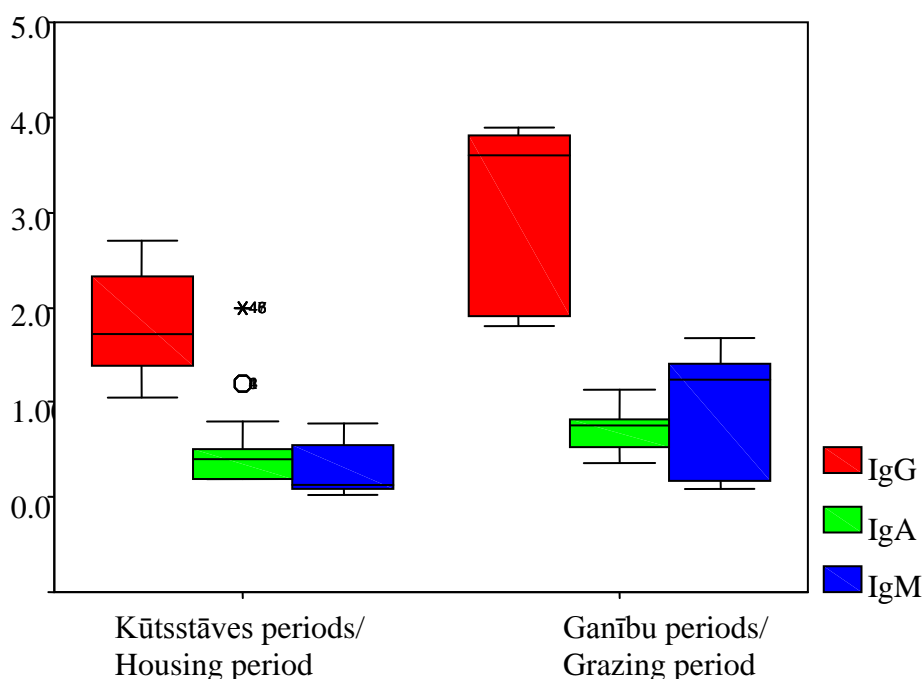
Turpretim cita, Latvijā veikta pētījuma rezultāti liecina, ka IgG koncentrācija govju pienā būtiski neatšķiras atkarībā no govju turēšanas apstākļiem, turpretim IgM vērtības atšķiras būtiski (Zagorska u.c., 2007).

Iespējams tas norāda, ka sezonālā govju turēšanā vairāk izpaužas sezonas, kā turēšanas apstākļu ietekme.

Pētījumā konstatējām, ka imunoglobulīna A koncentrācija pienā būtiski palielinās govīm pārejot no kūststāves uz ganību periodu ( $p < 0.001$ ), tātad IgA tāpat kā SŠS lielāko vidējo vērtību sasniedz ganību periodā. Kā iepriekš aprakstīts ganību periodā tesmens pakļauts intensīvākai apkārtējās vides iedarbībai un dažāda veida kairinājumiem. Augstā IgA koncentrācija šai periodā iespējams norāda, ka tesmeņa audu aizsardzībā līdz ar SŠS primāra un nozīmīga loma ir tieši IgA. Šis imunoglobulīns iesaistās tesmeņa audu aizsardzībā jau agrīnā to kairinājuma stadijā, kavē baktēriju pielipšanu tesmeņa epitēlija šūnām, aglutinē tās un neitralizē baktēriju toksīnus (Watson, 1980; Korhonen, Kaartinen, 1995). Mūsaprāt nevar piekrist apgalvojumam, ka govju tesmenī sekretorais IgA ir mazaktīvs, jo salīp ar piena tauku lodītēm, tāpēc tam nav lielas nozīmes tesmeņa audu aizsardzībā (Lascelles, McDowell, 1970; Tizard, 2000).

Konstatējām, ka kūststāves periodā IgG un IgM saturs **piena paraugos** svārstās daudz plašākā amplitūdā, kā ganību sezonā. IgA vērtību svārstību amplitūda nav tik izteikta, tomēr salīdzinoši lielākas IgA vērtību svārstības novēro ganību periodā. Atsevišķos piena paraugos imunoglobulīnu vērtības, atrodas aiz standartnoviržu robežām, kas iespējams liecina par govju individuālā faktora nozīmīgo lomu imunoglobulīnu producēšanā (Guidry & Miller, 1986).

5.attēlā parādītas imunoglobulīnu G, A un M vērtības asins serumā un šo vērtību svārstību svārstību amplitūda kūststāves un ganību periodos.



**5.att. Imunoglobulīnu G, A un M daudzums asins serumā ( $gl^{-1}$ ) kūststāves un ganību periodos**  
**Fig 5. Immunoglobulin G, A, and M amount in the blood serum ( $gl^{-1}$ ) during the housing and grazing period**

**Asins serumā** visaugstākās IgG, IgA un IgM vidējās vērtības konstatētas **ganību periodā**, attiecīgi 2.98 (0.89)  $\text{gl}^{-1}$ , 0.70 (0.20)  $\text{gl}^{-1}$ , 0.84 (0.61)  $\text{gl}^{-1}$ , kad tās ir būtiski augstākas ( $p < 0.001$ ) kā kūststāves laikā.

Iespējams, tas liecina par imūnsistēmas aktivācijas procesiem, kas noris saistībā ar govju brīvo turēšanu, kustību iespējām, pilnvērtīgākas un kvalitatīvākas barības pieejamību ganību periodā (Michalek et al., 1975; Deptula, 1987).

### **Imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un asins serumā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību**

Ir atšķirīgi pētījumu rezultāti par imunoglobulīnu G, A, M daudzumu veselā un patogēno mikroorganismu inficētā piena dziedzerī, kas visbiežāk sniedz informāciju par imunoglobulīnu dinamiku govju pienā klīnisku un akūtu mastītu gadījumos.

Kā norādīts literatūrā, imunoglobulīnu G, A un M daudzums pienā ievērojami pieaug tesmeņa iekaisuma laikā, kad tie aktīvi iesaistās piena dziedzerā imunoloģiskajās reakcijās pret tesmenī iekļuvušajiem patogēniem (Harmon et al., 1975; Hidiroglou et al., 1992; Butler, 1994; McFadden et al., 1997; Kawai et al., 1999). Iekaisuša tesmeņa pienā to koncentrācija var pieaugt 3-5 reizes (Sandholm, Korhonen, 1995), 10 un vairāk reizes (Korhonen, Kaartinen, 1995).

Veicām izpēti, lai noskaidrotu kādas ir imunoglobulīnu G, A un M vērtības pienā un asins serumā, kad govīm nediagnostiķē akūtas un klīniskas formas mastītus:

#### **Piena paraugos**

**IgG** vidējā vērtība paraugos ar patogēniem ierosinātājiem un bez patogēniem atšķiras ļoti nedaudz, attiecīgi 2.23 (0.84)  $\text{gl}^{-1}$  un 2.19 (0.69)  $\text{gl}^{-1}$ , **IgA** vidējā vērtība paraugos bez patogēniem ierosinātājiem ir nedaudz augstāka, kā paraugos, kuros atrasti mastītu ierosinātāji, attiecīgi 1.49 (0.86)  $\text{gl}^{-1}$  un 1.23 (0.57)  $\text{gl}^{-1}$ . Arī **IgM** vidējā vērtība ir augstāka paraugos bez patogēnajiem ierosinātājiem, attiecīgi 1.71 (0.87)  $\text{gl}^{-1}$  un 1.45 (0.87)  $\text{gl}^{-1}$ .

Imunoglobulīnu G, A un M vidējie rādītāji būtiski neatšķiras piena paraugos ar un bez patogēnajiem mastīta ierosinātājiem ( $p > 0.05$ ).

#### **Asins seruma paraugos**

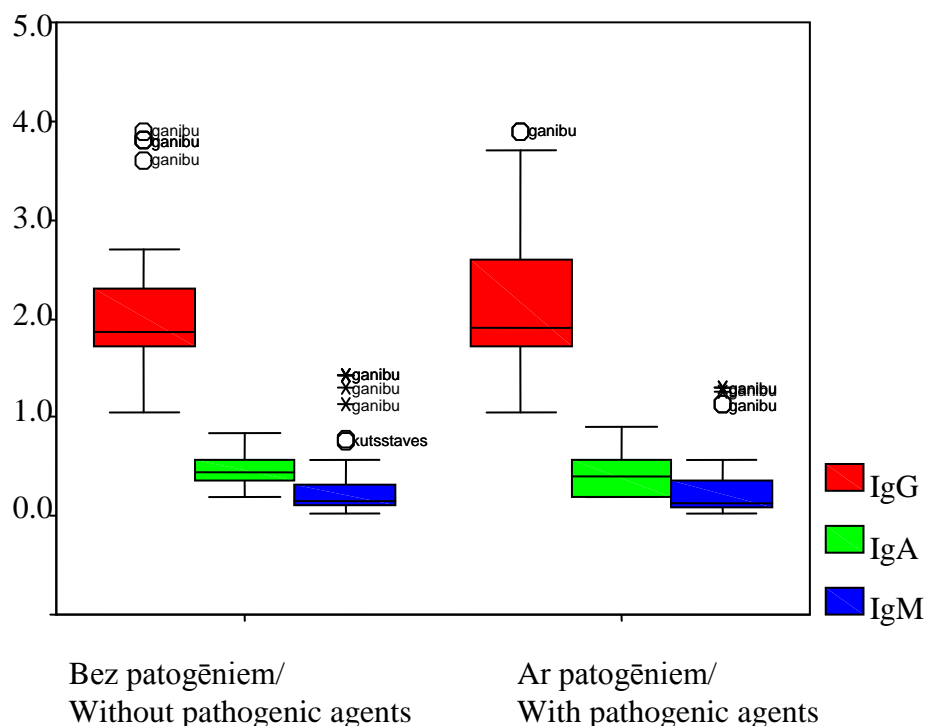
**IgG** vidējā vērtība 2.17 (0.77)  $\text{gl}^{-1}$  ir lielāka to govju asins seruma paraugos, kuru pienā atklāti patogēnie mikroorganismi. Govīm, kuru pienā patogēnos mastīta ierosinātājus neidentificējām, IgG vidējā vērtība asins serumā ir 2.01 (0.67)  $\text{gl}^{-1}$ .

**IgA** vidējās vērtības asins seruma paraugos ir līdzīgas govīm, kuru pienā atklāti patogēnie mikroorganismi un govīm, kuru pienā patogēno mikroorganismu nav, attiecīgi 0.42 (0.22)  $\text{gl}^{-1}$  un 0.44 (0.16)  $\text{gl}^{-1}$ .

**IgM** vidējās vērtības asins seruma paraugos ir līdzīgas govīm, kuru pienā atklāti patogēnie mikroorganismi un govīm, kuru pienā patogēno mikroorganismu nav, attiecīgi 0.32 (0.41)  $\text{gl}^{-1}$  un 0.30 (0.35)  $\text{gl}^{-1}$ .

Imunoglobulīnu G, A un M vidējie rādītāji arī asins serumā būtiski neatšķiras atkarībā no govju tesmeņu inficētības ( $p > 0.05$ ).

6.attēlā iespējams salīdzināt imunoglobulīnu G, A un M vērtības un to svārstību amplitūdu govju asins serumā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību.



**6.att. Imunoglobulīnu G, A un M daudzums (gl<sup>-1</sup>) govju asins serumā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību**

**Fig. 6. Immunoglobulin G, A, and M amount (gl<sup>-1</sup>) in cows blood serum in relation with the infection of udder quarters**

Attēlā var novērot, ka vidējie rādītāji ir ļoti līdzīgi abām grupām, tomēr imunoglobulīnu G, A, M vērtību svārstību amplitūda ir lielāka to govju asins serumā, kuru tesmeņi ir inficēti, īpaši to novēro attiecībā uz IgG maksimālām vērtībām. Atsevišķos paraugos imunoglobulīnu vērtības neiekļaujas vērtību standartnoviržu robežās, kas iespējami liecina par individuālā faktora nozīmīgo lomu imunoglobulīnu G, A un M producēšanā (Guidry & Miller, 1986).

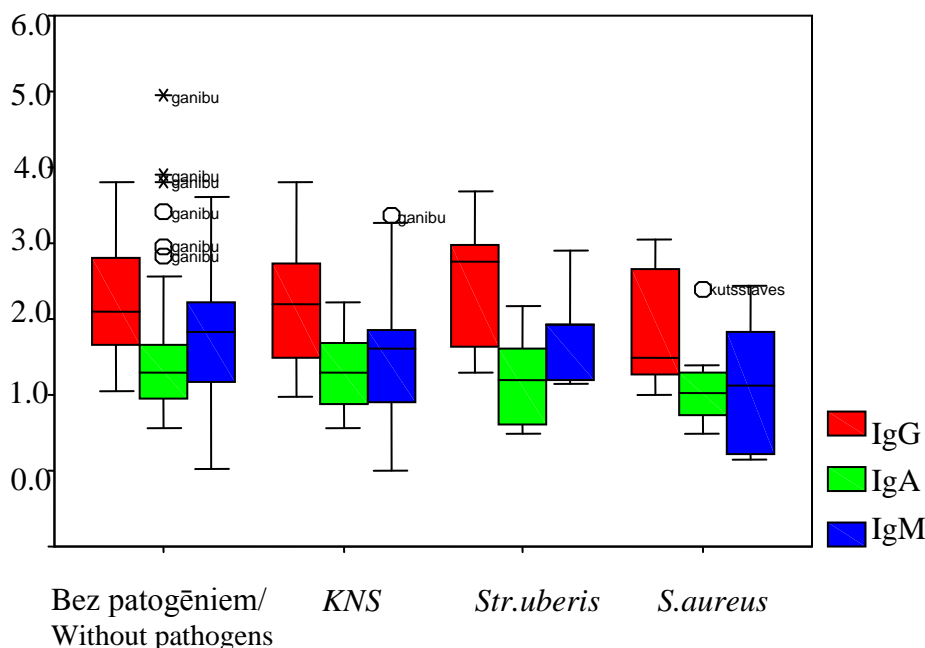
Publikācijās norādīts, ka imunoglobulīnu G, A, M koncentrācija govju pienā un asinīs ievērojami palielinās līdz ar tesmeņa inficētību (Butler, 1994). Novērots, ka klīnisku mastītu gadījumos govju pienā imunoglobulīnu daudzums var ievērojami pieaugt (Avery, Gordon, 1991; Korhonen et al., 2000), jo īpaši akūtas tesmeņa infekcijas laikā (Mackie, Logan, 1986).

Novērojām, ka salīdzinot ar veselām govīm, govīm, kurām ir latents un subklīnisks tesmeņa iekaisums imunoglobulīnu G, A, M vērtības pienā un asins serumā būtiski nepalielinās.

Iespējams, mūsu rezultāti liecina:

- imunoglobulīnu G, A, M paaugstinātā koncentrācija tesmenī nodrošina tesmeņa audu seromukozālo aizsardzību, gan tām govīm, kurām tesmenī identificēti patogēnie mikroorganismi, gan tām, kurām tesmeņi neinficēti. Tādējādi tiek ierobežota mastītu izplatība ganāmpulkā;
- imunoglobulīnu G, M paaugstinātā koncentrācija tesmenī tiek uzturēta tiem pastiprināti ieceļojot no asinsrites, savukārt IgA palielinātā daudzumā tiek secernēts tesmeņa audos.

Veicot padziļinātu izpēti, noteicām arī imunoglobulīnu G, A un M koncentrāciju govju pienā un asins serumā saistībā ar tesmenī esošiem, konkrētajiem patogēniem (7.attēls).



### 7.att. Imunoglobulīnu G, A un M daudzums (g l<sup>-1</sup>) pienā saistībā ar patogēnajiem ierosinātajiem tesmeņu ceturkšņos

Fig 7. Immunoglobulin G, A, and M amount (g l<sup>-1</sup>) in milk in relation with pathogenic agents in the udder quarters

Kā liecina pētījuma dati, imunoglobulīnu vērtības ir sekojošas:

#### Piena paraugos:

**IgG** augstākā vidējā vērtība 2.70 (0.32) g l<sup>-1</sup> ir *Str.uberis* infekcijas gadījumā, bet zemāko vērtību 1.35 (0.32) g l<sup>-1</sup> novēro *S.aureus* infekcijas gadījumā, tā ir pat zemāka nekā imunoglobulīna G vērtība veselo ceturkšņu pienā. Savukārt *KNS* inficēto ceturkšņu pienā novēro vislielākās vērtību svārstības.

**IgA** vērtības inficētu ceturkšņu pienā ir zemākas par tā vērtībām veselu ceturkšņu pienā. Viszemākā vērtība 1.20 (0.42) g l<sup>-1</sup> ir *S.aureus* infekcijas gadījumā, nedaudz augstāka tā ir *KNS* un *Str.uberis* infekciju gadījumos, attiecīgi 1.30 (0.21) g l<sup>-1</sup> un 1.29 (0.44) g l<sup>-1</sup>.

Arī **IgM** vērtības inficētu ceturkšņu pienā ir zemākas par tā vērtībām veselu ceturkšņu pienā. Viszemākā vidējo vērtību 1.27 (0.49) g l<sup>-1</sup>, līdzīgi kā imunoglobulīniem G un A, novēro *S.aureus* skarto ceturkšņu pienā.

Imunoglobulīnu G, A un M koncentrāciju pienā būtiski neietekmē tesmeņa ceturksnī esošais patogēnā ierosinātāja veids ( $p > 0.05$ ).

7.attēls uzskatāmi parāda, ka imunoglobulīniem G, A, M pienā nenovēro lielas vidējo vērtību atšķirības saistībā ar tesmeņu ceturkšņos identificētajiem patogēniem mastīta ierosinātājiem. Tomēr salīdzinoši neliels IgG vērtību pieaugumu pienā vērojams *Str.uberis* infekcijas gadījumā. Jāatzīmē, ka piena paraugos ar patogēniem ierosinātajiem, jo īpaši *Str.uberis* un *S.aureus* gadījumos, novēro lielāku imunoglobulīnu vērtību svārstību amplitūdu, kā paraugos, kuros patogēnie mikroorganismi nav identificēti.

## Asins seruma paraugos:

**IgG, IgA un IgM** augstākās vidējās vērtības, attiecīgi 2.62 (0.74)  $\text{g l}^{-1}$ , 0.51 (0.24)  $\text{g l}^{-1}$  un 0.50 (0.46)  $\text{g}^{-1}$ , sasniedz *S.aureus* izraisītas tesmeņa infekcijas gadījumā, savukārt *KNS* un *Str.uberis* patogēni nespēj izraisīt imunoglobulīnu koncentrācijas pieaugumu asinīs.

Pētījuma rezultāti pierāda, ka imunoglobulīnu G, A un M vidējās vērtības asins serumā būtiski atšķiras atkarībā no tesmeņa ceturksnī esošā patogēnā ierosinātāja veida (IgG  $p > 0.05$ , IgA  $p > 0.001$ , IgM  $p > 0.001$ ).

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka latentā un subklīniskā tesmeņa iekaisumu laikā vienīgi *S.aureus* spēj izraisīt imunoglobulīnu G, A, M koncentrācijas pieaugumu govju asins serumā.

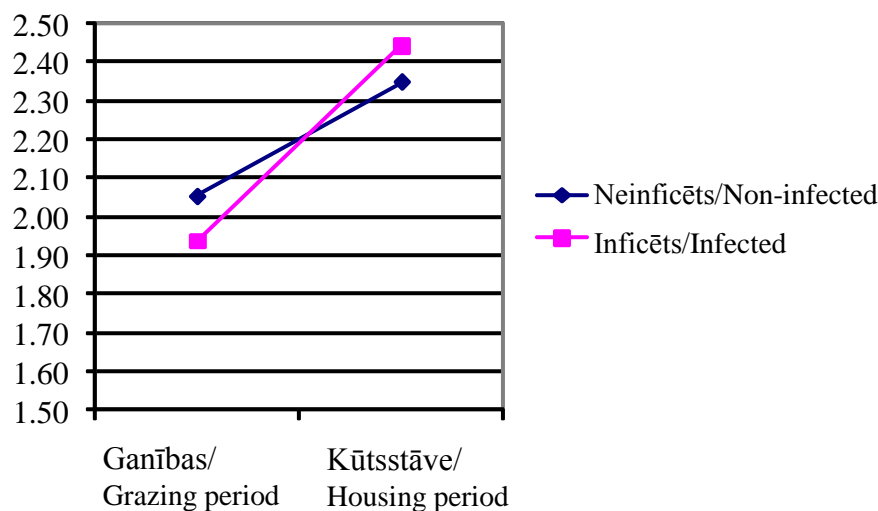
Ir ziņojumi par to, ka imunoglobulīnu koncentrācija pienā un asinīs ir vērtējama kopsakarībā ar mastītu izraisīto patogēno mikroorganismu sugām, iekaisuma raksturu un ilgumu (Rainard, Caffin, 1983; Anderson et al., 1986). Pienā tā nozīmīgi pieaug akūtu tesmeņa infekciju laikā (Guidry et al., 1980 (a); Östensson, Lun, 2008), jo īpaši endotoksīnu inducētu mastītu gadījumā (Persson et al., 1992), turpretim hroniska iekaisuma gaitā, piemēram, *S.aureus* mastīta gadījumā, nav konstatētas imunoglobulīnu daudzuma atšķirības (Doymaz, 1988).

Pausts viedoklis, ka *Str. uberis* inducētu tesmeņu iekaisumu gaitā imunoglobulīnu opsonējošā aktivitāte pienā un asins serumā ir zema, tāpēc specifiskās antivielas nav tesmeņa aizsargātājas šīs infekcijas gadījumā (Hill et al., 1994). Mūsu iegūtie rezultāti apliecina imunoglobulīnu G, A, M zemo aktivitāti asins serumā *Str. uberis* tesmeņa infekcijas gadījumā, savukārt pienā šīs infekcijas laikā novērojām paaugstinātu IgG koncentrāciju. Arī cits pētījums sniedz norādi, ka IgG iesaistās tesmeņa audu aizsardzībā *Str.uberis* izraisītu akūtu un subakūtu infekciju gadījumā (Fang et al., 1998), iespējams tāpēc, ka laktoferīns kā nozīmīgs govju tesmeņa aizsargfaktors maz inhibē *Streptokokku dzimtas* patogēnus (Arnold et al., 1980; Reiter, 1985).

### **Imunoglobulīnu G, A un M koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību**

Izvērtējot imunoglobulīnu G, A un M koncentrāciju pienā kūtsstāves un ganību periodos, saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību, secinājām, ka sezonālās turēšanas un patogēno ierosinātāju mijiedarbības efekts būtiski neietekmē imunoglobulīnu koncentrāciju pienā ( $p > 0.05$ ), tomēr novērojām atsevišķas tendences:

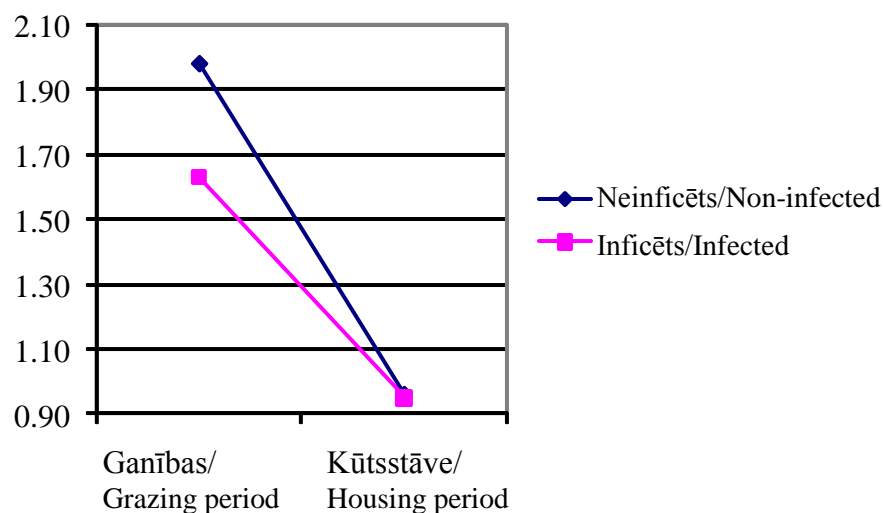
**IgG** vidējā vērtība pienā kūtsstāves periodā ir augstākā gan paraugos ar patogēnajiem ierosinātājiem, gan bez tiem, savukārt ganību periodā IgG koncentrācija ir augstāka neinficēto tesmeņa ceturkšņu piena paraugos (8.attēls).



**8. att. Imunoglobulīna G vērtību (g l<sup>-1</sup>) dinamika pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņa inficētību**

**Fig. 8. The dynamics of immunoglobulin G values (g l<sup>-1</sup>) in milk during the housing and grazing period in relation with the udder infection**

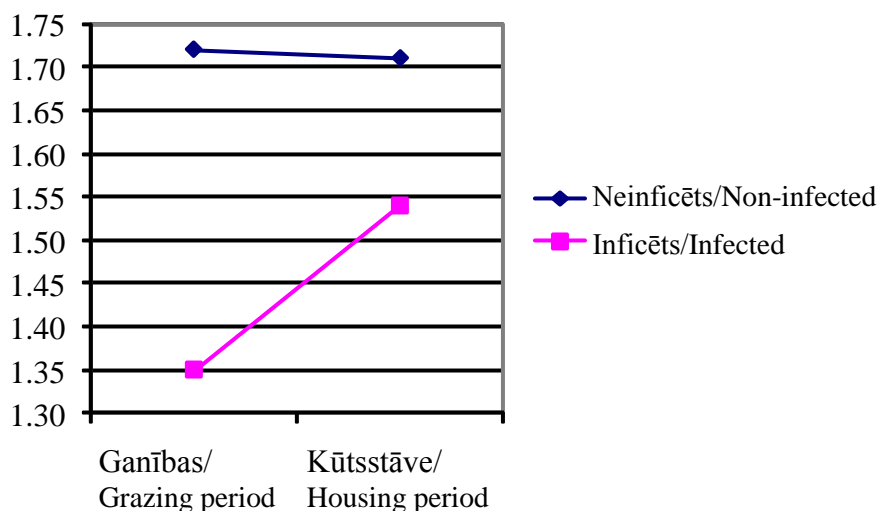
IgA vidējā vērtība ganību periodā ir augstāka gan paraugos ar patogēnajiem ierosinātājiem, gan bez tiem, turklāt ganību periodā, lielāka IgA vērtība, līdzīgi kā IgG, konstatēta neinficēto tesmeņa ceturkšņu piena paraugos (9.attēls).



**9.att. Imunoglobulīna A vērtību (g l<sup>-1</sup>) dinamika pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņa inficētību**

**Fig. 9. The dynamics of immunoglobulin A values (g l<sup>-1</sup>) in milk during the housing and grazing period in relation with the udder infection**

Iegūtie rezultāti vēlreiz norāda un apliecina, ka IgG un IgA koncentrāciju pieaugumam pienā ir sezonāls raksturs (Guidry & Miller, 1986; Conesa et al., 2005; Konuspajeva, 2007), turklāt ganību periodā imunoglobulīnu G un A koncentrācijai ir tendence pieaugt neinficētu ceturkšņu pienā.



#### 10. att. Imunoglobulīna M vērtību (gl<sup>-1</sup>) dinamika pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņa inficētību

Fig. 10. The dynamics of immunoglobulin M values (gl<sup>-1</sup>) in milk during the housing and grazing period in relation with the udder infection

IgM vidējās vērtības kūtsstāves un ganību periodā ir augstākas neinficētu ceturkšņu pienā un tās visa gada laikā ir aptuveni vienādas, savukārt inficētu ceturkšņu pienā kūtsstāves periodā novēro IgM vērtību strauju pieaugumu (10.attēls). Analizējot IgM vērtības pienā konstatējam, ka sezonālās turēšanas ietekmē tikai inficēto ceturkšņu pienā pieaug imunoglobulīna M koncentrācija.

#### Laktoferīna vērtības pienā

Pētnieciskajā literatūrā galvenokārt ir sastopami dati par laktoferīna, kā antibakteriāla faktora darbību. Norādīts, ka veselu govju pienā laktācijas vidusposmā laktoferīna koncentrācija ir zema, bet tā pieaug tesmeņa iekaisuma laikā (Sandholm, Korhonen, 1995; Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003; Diarra et al., 2003). Tomēr ir pētījumi, kas liecina, ka laktoferīna daudzumu govju pienā ietekmē arī citi faktori, piemēram, govju šķirne, vecums veselības stāvoklis laktācijas periods, govju turēšanas apstākļi (Harmon, 1975; Senft et al., 1976; Welty et al., 1976; Kutila et al., 2003; Zagorska, 2007; Konuspajeva et al., 2007). Pieejamie dati, par Lf koncentrāciju veselu govju pienā ir atšķirīgi. Publikācijās minēts, ka laktācijas vidusposmā Lf koncentrācija pienā ir 0.02 gl<sup>-1</sup> – 0.35 gl<sup>-1</sup> (Welty, 1976), 0.1 gl<sup>-1</sup>- 0.35 gl<sup>-1</sup> (Harmon, 1975), bet subklīnisko mastītu skarto govju pienā tā ir no 0.2 gl<sup>-1</sup> līdz 1.2 gl<sup>-1</sup> (Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003). Klīnisko mastītu gadījumā laktoferīna koncentrācija var sasniegt pat 8.0 gl<sup>-1</sup> (Harmon, 1975) un vairāk (Korhonen, Kaartinen, 1995).

Mūs iegūtie rezultāti liecina, ka vidējā laktoferīna koncentrācija govju pienā ir 0.61 (0.50) gl<sup>-1</sup>, kas ir augstāka par literatūrā norādītajām normām veselām govīm. Lf vērtības svārstās plašā amplitūdā no 0.00 gl<sup>-1</sup> līdz 4.40 gl<sup>-1</sup>. Pētījumos noskaidrots, ka Lf koncentrācija pienā ievērojami

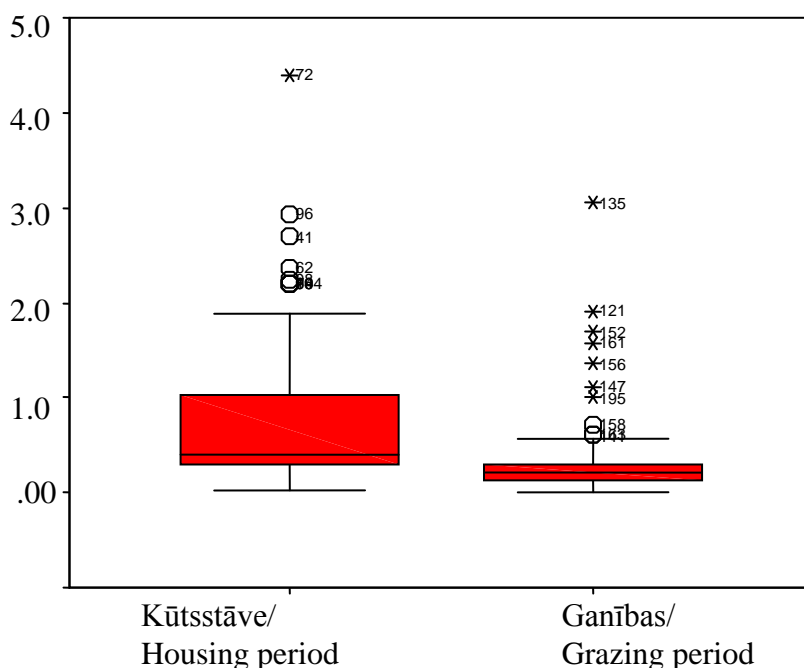
variē atsevišķu govju starpā (Kutilla et al., 2003), kā arī vienas govju tesmeņa ceturkšņu ietvaros (Welty et al., 1976). Vērtību svārstības tesmeņa ceturkšņu ietvaros tiek skaidrotas ar iepriekš pārslimotu mastītu kādā no tesmeņa daivām (Watson 1980).

### Laktoferīna koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos

Publikācijās norādīts, ka laktoferīna daudzums pienā nozīmīgi variē saistībā ar sezonu (Konuspayeva et al., 2007) un govju turēšanas sistēmas (Zagorska 2007).

Mūsu pētījumā laktoferīna vidējā koncentrācija pienā kūtsstāves periodā ir 0.739 (0.54)  $g\ l^{-1}$ , bet ganību periodā 480.4 (0.55)  $g\ l^{-1}$  un kūtsstāves periodā tā ir būtiski ( $p < 0.05$ ) augstāka.

11.attēlā uzskatāmi norādīts, ka kūtsstāves periodā, kad vērojama augstākā laktoferīna koncentrācija, arī vērtību svārstību amplitūdas ir izteiktākas. Jo īpaši vērtību svārstības ir lielākas virzienā uz maksimālām vērtībām. Gan kūtsstāves, gan ganību periodos atsevišķām govīm ir izteiktas laktoferīna vērtību novirzes ārpus standartnoviržu robežām, kas iespējams apstiprina individuālā faktora nozīmīgo lomu Lf līmeņa uzturēšanā (Watson 1980; Kutilla et al., 2003).



11.att. Laktoferīna daudzums ( $g\ l^{-1}$ ) pienā kūtsstāves un ganību periodos  
 Fig. 11. Lactoferrin amount ( $g\ l^{-1}$ ) in milk during the housing and grazing period

### Laktoferīna koncentrācija pienā saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību

Ir atšķirīgi pētījumu rezultāti par Lf daudzumu un vērtību svārstībām veselā un patogēno mikroorganismu skartajā piena dziedzerī, un galvenokārt pētīta laktoferīna vērtību dinamika klīnisku un akūtu mastītu gadījumos (Bishop et al., 1976; Ellison et al., 1988; David et al., 1993; Kai et al., 2003).

Izpētīts, ka tesmeņa subklīniska iekaisuma laikā laktoferīna koncentrācija govīm pienā var palielināties no 2 līdz 10 reizēm (Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003), bet klīnisku mastītu gadījumos pat līdz 10 - 100 reizēm (Korhonen H., Kaartinen L. 1995). Izpētīts, ka pastāv ievērojama atšķirība starp Lf koncentrāciju pienā akūtu un subklīnisku tesmeņa iekaisumu laikā.



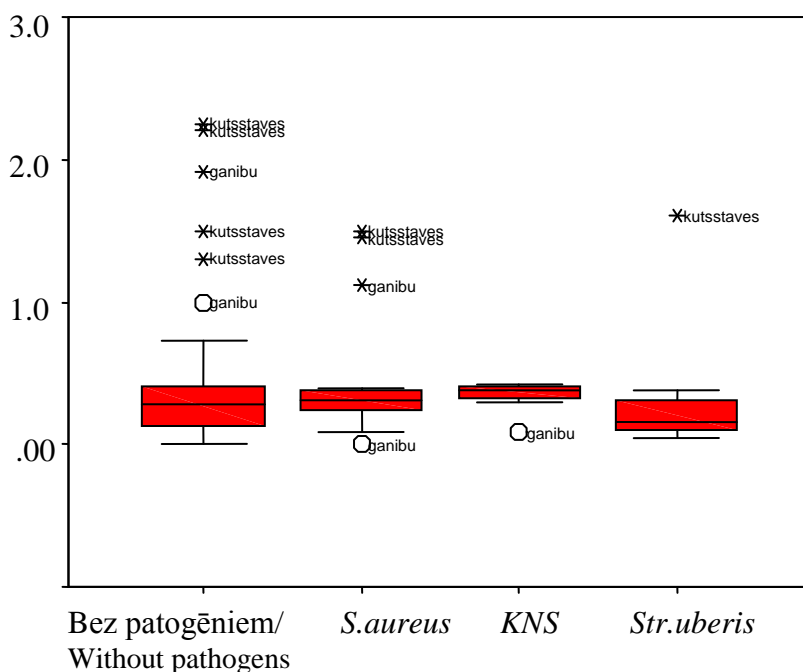
Subklīniska iekaisuma laikā laktoferīna koncentrācija sastāda tikai 1/3 daļu no koncentrācijas, kāda tā ir akūta iekaisuma laikā (Pereira et al., 1998).

Mūsu rezultāti liecina, ka laktoferīna vidējā vērtība piena paraugos bez patogēniem mikroorganismiem ir 0.405 (0.47)  $g\ l^{-1}$ , un tās saturs svārstās robežās, no 0.00  $g\ l^{-1}$  līdz 2.25  $g\ l^{-1}$ . Piena paraugos ar patogēniem mastīta ierosinātājiem Lf vidējā vērtība ir līdzīga, proti 0.400 (0.40)  $g\ l^{-1}$ , bet vērtību svārstības ir mazākas, no 0.02  $g\ l^{-1}$  līdz 1.60  $g\ l^{-1}$ . Mūsu aprēķini liecina, ka laktoferīna vidējie rādītāji pienā būtiski neatšķiras ( $p>0.05$ ) paraugos ar un bez patogēnajiem ierosinātājiem.

Publikācijās minēts, ka laktoferīna koncentrācija subklīniski un klīniski slimo ceturkšņu pienā variē atkarībā no mastītu izraisošajām baktēriju sugām un to patogenitātes (Hagiwara et al., 2003; Ahmad. et al., 2007). Noskaidrots, ka visu baktēriju, izņemot *Corynebacterium bovis* izraisīto mastītu gadījumos, Lf koncentrācija pienā, ir ievērojami augstāka, kā koncentrācija veselu govju pienā (Hagiwara et al., 2003).

Veicām padziļinātu izpēti un analizējām Lf koncentrāciju pienā atsevišķi katra patogēnā mastīta ierosinātāja gadījumā. Rezultāti liecina, ka laktoferīns augstāko vidējo vērtību 0.437 (0.440)  $g\ l^{-1}$  sasniedz KNS infekciju gadījumos. *S.aureus* un *Str.uberis* izraisīto mastītu laikā Lf vidējās vērtības ir zemākas, attiecīgi ir 0.410 (0.551)  $g\ l^{-1}$  un 0.345 (0.107)  $g\ l^{-1}$ . Dispersijas analīzes rezultāti parāda, ka laktoferīna vidējie rādītāji pienā atšķiras būtiski ( $p<0.05$ ) atkarībā no patogēno ierosinātāju veidiem tesmeņu ceturkšņos. Jāpiebilst, ka visaugstāko Lf vērtību, 2.25  $g\ l^{-1}$ , tomēr konstatējam neinficēta ceturkšņa pienā.

12.attēlā norādīta laktoferīna koncentrācija pienā saistībā ar tesmeņu ceturkšņos esošajiem patogēniem.



12. att. Laktoferīna daudzums ( $g\ l^{-1}$ ) pienā saistībā ar patogēnajiem ierosinātājiem tesmeņu ceturkšņos

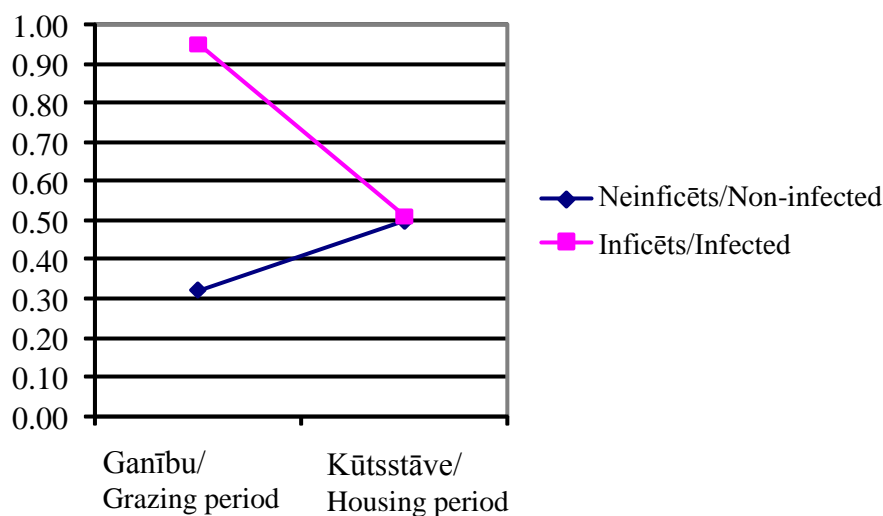
Fig. 12. Lactoferrin amount ( $g\ l^{-1}$ ) in milk in relation with the pathogenic agents in the udder quarters

Izpētīts, ka laktoferīns, kā nozīmīgs govs tesmeņa aizsargfaktors maz inhibē *Streptokokku dzimtas* patogēnus, to zemās dzelzs nepieciešamības dēļ (Arnold et al., 1980; Watson, 1980; Reiter, 1985, kā arī izrāda zemu antibakteriālu aktivitāti pret *S.aureus* (Nonnecke, Smith, 1984(1); Rainard, 1986). Tomēr citi rezultāti liecina, ka vidējā Lf koncentrācija *S.aureus* un *Streptococci* inficētu ceturkšņu producētajā pienā ir ievērojami augstāka, kā *KNS* inficēto ceturkšņu pienā (Hagiwara et al., 2003).

Noskaidrots, ka laktoferīna koncentrācija tesmeņa iekaisuma laikā atkarīga ne tikai no patogēnā ierosinātāja veida un patogenitētes, bet arī no iekaisuma rakstura un ilguma (Harmon et al., 1975; Kawai et al., 1999; Hagiwara et al., 2003), visaugstāko koncentrāciju tā sasniedz akūtu mastītu gadījumos (Harmon et al., 1976; Kawai et al., 1999).

### Laktoferīna koncentrācija pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību

Kā minēts iepriekš, Lf vērtības kūtsstāves periodā ir būtiski augstākas ( $p < 0.05$ ), salīdzinājumā ar ganību periodu. Kūtsstāves periodā inficēto un neinficēto ceturkšņu pienā Lf vidējās vērtības ir līdzīgas, attiecīgi  $0.500$  ( $0.560$ )  $\text{gl}^{-1}$  un  $0.516$  ( $0.430$ )  $\text{gl}^{-1}$ , savukārt ganību periodā ir liela Lf vērtību atšķirība inficēto un neinficēto ceturkšņu pienā, attiecīgi  $0.953$   $\text{gl}^{-1}$  un  $0.319$   $\text{gl}^{-1}$ . Ganību periodā laktoferīna aktivitāte ir augstāka inficētajos tesmeņa ceturkšņos (13.att.).



13.att. Laktoferīna vērtību ( $\text{gl}^{-1}$ ) dinamika pienā kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu ceturkšņu inficētību

Fig. 13. The dynamics of lactoferrin values ( $\text{gl}^{-1}$ ) in milk during the housing and grazing period in relation with the udder quarters infection

Kā iepriekš norādījām, ganību periodā SŠS ievērojami pieaug piena paraugos bez patogēniem mikroorganismiem, savukārt laktoferīna koncentrācija neinficēto ceturkšņu pienā augstāka ir kūtsstāves laikā. Iespējams tas apstiprina apgalvojumu, ka laktoferīns tāpat kā somatiskās šūnas tesmenī aktīvi reaģē arī uz tesmeņa audu neinfekciozu kairinājumu (Harmon et al., 1975). Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka sezonālās turēšanas un patogēno ierosinātāju mijiedarbība būtiski ( $p < 0.05$ ) ietekmē laktoferīna koncentrāciju pienā

Iespējams, ka mūsu pētījumā iegūtās Lf vērtības norāda uz to, ka laktoferīna paaugstinātā koncentrācija tesmenī nodrošina tesmeņa seromukozo audu aizsardzību, gan tām govīm, kurām tesmenī identificēti patogēnie mikroorganismi, gan tām, kurām patogēni nav identificēti. Tādējādi

bakteriostatiskas un baktericīdas darbības rezultātā laktoferīns ierobežo tesmeņu infekciju izplatību (Arnold et al., 1980; Kawai et al., 1999; Ka iet al., 2002; Hagiwara et al., 2003).

### **Korelācijas starp imunoglobulīnu G, A, M koncentrāciju pienā un asins serumā, laktoferīna koncentrāciju un SŠS pienā**

Veicot korelāciju analīzi ar mērķi noskaidrot sakarību ciešumu un nozīmīgumu starp imunoglobulīnu G,A,M koncentrāciju pienā un asinīs, laktoferīna koncentrāciju pienā un somatisko šūnu skaita rādītājiem pienā secinājām, ka **ciešas**, statistiski nozīmīgas savstarpējas sakarības neveido neviens no pētāmajiem rādītājiem.

Pāru korelācijas analīzes rezultāti liecina, ka statistiski nozīmīgas ( $\alpha=0.01$ ) **vidēji ciešas negatīvas sakarības** pastāv starp sekojošiem rādītājiem:

**IgG pienā un IgG asinīs** ir vidēji cieša negatīva savstarpēja korelācija, korelācijas koeficients  $r = - 0.488$ ;

**IgM pienā un IgM asinīs** ir vidēji cieša negatīva savstarpēja korelācija, korelācijas koeficients  $r = - 0.458$ ;

Arī Guidry et al, 1980(c) pētījuma rezultāti liecina, ka starp **IgG pienā un IgG asinīs** pastāv savstarpēja negatīva korelācija un IgG tiek selektīvi transportēts no asinsrites pienā. To apstiprina arī Caffin, Poutrel, 1988, kas savukārt precizējuši, ka šādu korelāciju nenovēro neinficētu ceturkšņu pienā.

Mūsu pētījuma dati liecina, ka arī starp **IgM pienā un IgM asinīs** pastāv vidēji cieša negatīva korelācija. Publikācijās minēts, ka IgM koncentrācijas pieaugums pienā norāda uz tesmeņa nesenu infekciju un, ka šis imunoglobulīns pastiprināti ieceļo no asinsrites tesmeņa audos tieši agrīnas infekcijas laikā (Coico et al, 2003, Janeway & Travers, 1994). Tāpēc varam izdarīt pieņēmumu, ka daļai govju ir tesmeņa subklīniski iekaisumi agrā to stadijā, un lokālās tesmeņa aizsargreakcijās aktīvi iesaistās arī no asinsrites tesmenī ieceļojušais IgM.

Statistiski nozīmīgas ( $\alpha=0.01$ ) **vidēji ciešas pozitīvas savstarpējas sakarības** veido IgG asinīs, IgA asinīs un IgM asinīs.

**IgG asinīs un IgA asinīs**, korelācijas koeficients  $r = 0.532$ ;

**IgG asinīs un IgM asinīs**, korelācijas koeficients  $r = 0.894$ ;

**IgA asinīs un IgM asinīs**, korelācijas koeficients  $r = 0.486$ .

Kas iespējams liecina, ka šo klašu Ig koncentrācijas uzturēšanai asins serumā ir kopēji cēloņi un regulācijas mehānisms.

**Laktoferīns ar imunoglobulīniem G, A, M pienā** veido statistiski nozīmīgas ( $\alpha=0.05$ ;  $\alpha=0.01$ ), bet vājas negatīvas korelācijas

**Laktoferīns un IgG**, korelācijas koeficients  $r = - 0.204$ ;

**Laktoferīns un IgA**, korelācijas koeficients  $r = - 0.143$ ;

**Laktoferīns un IgM**, korelācijas koeficients  $r = - 0.237$ .

Iegūtie rezultāti norāda uz tendenci, ka pētāmo apstākļu un pazīmju iedarbībā laktoferīna un imunoglobulīnu koncentrācija pienā mainās pretējos virzienos, kas apstiprinājās jau iepriekš aprakstītā Lf un IgG, IgA un IgM dinamikas analīzē kūtsstāves un ganību periodos saistībā ar tesmeņu inficētību.

Publikācijās minēti atšķirīgi viedokļi par Lf korelāciju ar pienā esošajiem imunoglobulīniem. Tā piemēram, ir pētījumi par to, ka Lf iedarbība ar imunoglobulīnu G spēj

paaugstināt Lf antimikrobās spējas (Wang, Hurley, 1998) un, ka specifiskās antivielas iedarbojoties ar Lf rada spēcīgāku antimikrobiālu efektu, nekā katrs iepriekšminētais komponents atsevišķi (Bullen et al., 1972; Harmon et al., 1975). Kazahijā veiktie pētījumi, liecina, ka starp Lf un imunoglobulīniem pienā pastāv pozitīva korelācija (Konuspayeva et al., 2007), tomēr mūsu iegūtie dati to neaplicina. Iespējams, ka iepriekšminētā pētījumā korelācija starp Ig un LF atrasta, jo pētīta to koncentrācija pienā klīnisku un akūtu tesmeņa iekaisumu gadījumos. Cita pētījuma rezultāti apgalvo, ka neakūtā tesmeņa iekaisuma stadijā laktoferīns nepotencē imunoglobulīnu aktivitāti un nav vērojamas to koncentrāciju savstarpējas sakarības (Moreau et al., 1983).

Mūsu pētījuma ietvaros veiktā korelācijas analīze liecina, ka **somatisko šūnu skaits** pienā neveido statistiski nozīmīgas korelācijas ne ar imunoglobulīniem G, A, M, ne laktoferīnu. Ir pētījumi, kuru rezultāti parāda, ka govju pienā pastāv korelācijas starp SŠS un laktoferīnu (Harmon et al., 1975; Hagiwara, 2003), kā arī starp SŠS un imunoglobulīniem G, A, M (Rogers, Sygne, 1978; Atiekh, 1979). Pētījumu rezultāti liecina, ka laktoferīna un imunoglobulīnu koncentrācija govju pienā pieaug proporcionāli SŠS pienā (Hagiwara, 2003). Pierādīts arī, ka neinficētos ceturkšņos IgG govs pienā korelē ar SŠS, taču tesmenim inficējoties, atkarībā no baktēriju sugas, korelācija mazinās vai izzūd pavisam (Caffin, Poutrel, 1988). Izpētīts, ka klīniska mastīta gadījumā imunoglobulīni un laktoferīns pozitīvi korelē ar SŠS pienā (Harmon et al. 1975; Atiekh, 1979; Persson et al., 1992), bet govju pienā subklīnisko un latento infekciju gadījumos korelāciju ar SŠS nenovēro (Atiekh, 1979). Ir apgalvojumi, ka gan SŠS, gan Lf, gan Ig vērtības svārstās atkarībā no iekaisuma stadijas, visaugstākās tās ir akūta tesmeņa iekaisuma laikā un arī korelācijas biežāk veidojas šajā iekaisuma stadijā (Harmon et al., 1975; Fang et al. 1998; Kawai et al., 1999; Hagiwara et al., 2003).

Mūsu pētījumā laktoferīna koncentrācija, imunoglobulīnu koncentrācija un somatisko šūnu skaits pienā mainās savstarpēji neatkarīgi, iespējams tāpēc, ka mūsu pētījumā nav analizēts klīniski slimu ceturkšņu piens, bet veselu un subklīniski slimu tesmeņu ceturkšņu piens.

## SECINĀJUMI

1. Govju sezonālā turēšana būtiski ietekmē somātisko šūnu skaitu ( $p < 0.05$ ), laktoferīna koncentrāciju ( $p < 0.05$ ) un imunoglobulīnu G, A koncentrāciju ( $p < 0.001$ ) govju pienā, kā arī imunoglobulīnu G, A, M daudzumu govju asins serumā ( $p < 0.001$ ).
2. Ganību periodā, salīdzinājumā ar kūtsstāves periodu būtiski pieaug somātisko šūnu skaits ( $p < 0.05$ ) un imunoglobulīna A koncentrācija pienā ( $p < 0.001$ ), kā arī imunoglobulīnu G, A, M daudzumu govju asins serumā ( $p < 0.001$ ), savukārt kūtsstāves periodā būtiski palielinās laktoferīna un imunoglobulīna G daudzums pienā, attiecīgi ( $p < 0.05$  un  $p < 0.001$ ).
3. Subklīniski inficēto tesmeņu ceturkšņu pienā būtiski pieaug somātisko šūnu skaits ( $p < 0.001$ ), savukārt laktoferīna un imunoglobulīnu G, A, M koncentrācija subklīniski inficēto un veselo ceturkšņu pienā būtiski neatšķiras ( $p > 0.05$ ). Tomēr atsevišķas patogēnās baktērijas būtiski ietekmē laktoferīna koncentrāciju pienā ( $p < 0.05$ ), kā arī imunoglobulīnu G, A, M daudzumu asins serumā ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ).
4. Govju sezonālās turēšanas un tesmenī esošo patogēno baktēriju mijiedarbības efekts būtiski ietekmē somātisko šūnu skaitu ( $p < 0.05$ ) un laktoferīna koncentrāciju ( $p < 0.05$ ) pienā. Ganību periodā, salīdzinājumā ar kūtsstāves periodu somātisko šūnu skaits būtiski palielinās neinficēto ceturkšņu piena paraugos ( $p < 0.05$ ), savukārt laktoferīna koncentrācija inficēto ceturkšņu piena paraugos ( $p < 0.001$ ).
5. Imunoglobulīniem G, A, M pienā un asins serumā un laktoferīnam pienā novēro plašu vērtību svārstību amplitūdu, kas iespējams norāda uz dzīvnieka individuālā faktora nozīmīgo lomu imunoloģisko aizsargreakciju formēšanā.
6. Augsta imunoglobulīnu G, A, M koncentrācija govju asins serumā un pienā, kā arī augsta laktoferīna koncentrācija pienā, spēj pasargāt tesmeni no infekcijas manifestācijas un mastītu izplatības ganāmpulkā.
7. Starp imunoglobulīna G koncentrāciju pienā un asins serumā ( $r = -0.488$ ) un imunoglobulīna M koncentrāciju pienā un asins serumā ( $r = -0.458$ ) pastāv vidēji ciešas negatīvas, statistiski nozīmīgas sakarības ( $\alpha = 0.01$ ), bet imunoglobulīni G, A un M asinīs savstarpēji veido statistiski nozīmīgas ( $\alpha = 0.01$ ), vidēji ciešas pozitīvas sakarības ( $r = 0.532$ ;  $r = 0.894$ ;  $r = 0.468$ ).

## ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Kociņa I., Lūsis I., Antāne V. (2007) Seasonal variation of the lactoferrin concentration, somatic cell count and subclinical mastitis occurrence in cows. *13th International Conference Production diseases in farm animals*, Leipzig, 490.p.
2. Lūsis I., Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L. (2007) Changes in Immunological Parameters and Lactose in Cows with Increased Somatic Cell Count in Milk. *Proceedings from a Mastitis symposium at the St Petersburg State Academy of Veterinary Medicine*, Russia, 18 p.
3. Lūsis I., Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L. (2006) Piena somātisko šūnu skaita, laktozes un govju organisma imunoloģisko rādītāju sakarību vērtējums. *LLU VMF Starptautiskās zinātniskās konferences „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna” raksti*. Jelgava, 2006, 166–170 lpp.
4. Kociņa I., Antāne V., Lūsis I. (2005) Immunoglobulins and Lactoferrin concentration in milk and bacteria causing subclinical mastitis in dairy cows. *Proceedings of the LUA 11th International scientific conference „Research for rural development”*. Jelgava, 2005., pp. 217-220.
5. Kociņa I., Antāne V., Lūsis I. (2004) Laktoferīna koncentrācijas izmaiņas pienā govīm kūststāvēs un ganību periodā, tā saistība ar tesmeņa veselības rādītājiem. *LLU VMF Starptautiskās zinātniskās konferences „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna” raksti*. Jelgava, 2004, 145 -149 lpp.
6. Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L., Lūsis I. (2003) Seasonal variation in Immune activity and occurrence of Subclinical mastitis of cows. *ESDAR and EVSSAR Scientific Conference „Reproduction in Domestic animals”*, Ireland, Vol.38/4, 345 p.
7. Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L. (2002) Tesmeņa veselības rādītāju un imunoglobulīna satura izmaiņas pienā un asinīs, govīm pārejot uz ganību periodu. *LLU VMF Starptautiskās zinātniskās konferences „Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna” raksti*. Jelgava, 2002, 110-115 lpp.
8. Kociņa I., Antāne V. (2001) How the welfare conditions affect milk quality to Latvian brown cows. *Animal Husbandry Scientific Articles 2001, appendix N 38*, Baisagola, pp.19-26.
9. Kociņa I., Antāne V. Praktiskie novērojumi par somātisko šūnu skaita izmaiņām govju pienā. *LLU VMF Starptautiskās zinātniskās konferences „Veterinārmedicīnas aktualitātes” raksti*. Jelgava, 2000, 84-89 lpp.

## INTRODUCTION

With the aim of facilitating endurance of dairy cows against mastitis caused by pathogenic microflora, intensive investigations in immunology have been carried out almost a century. However, remarkable contradictions still exist in this field of research and expected achievements are delayed.

For quite a long time, there were two types of opinions on immunological intervention in the mastitis control programs. The first one expresses the assumption that control of mastitis and promotion of immunological defense response in the udder are possible by improving the management measures (Craven, Williams, 1985; Barkema et al., 1999), as well as by carrying out genetic selection (Sanore, 2000). The second, different opinion is that most important role in mastitis control plays vaccination (Watson, 1980; Kenny et al, 1992).

Another opinion is that natural protective reactions of the animal, if they are not in a suppressed condition, can successfully restrict and eliminate the udder infection (Sandholm, Pyörälä, 1995). If the activity of the immunological system is reduced or the virulence of pathogenic microorganisms is high, infection, partly eliminated, may continue for a longer period, and usually this process becomes apparent as subclinical or chronic mastitis (Ali-Vehmas, Sandholm, 1995).

Investigations show evidence that those humoral immunity components as immunoglobulin A, G, M and antibacterial factor of the udder lactoferrin play an important role in immunological defense response of the cow udder (Kawai et al., 1999; Marnila, Korhonen, 2002; Hagiwara et al., 2003; Korhonen, Kaartinen, 2005). Unfortunately, concentration of immunoglobulins and lactoferrin is low in cows milk in the middle phase of lactation that is why the question is urgent how to stimulate and maintain in the udder a sufficient amount and spectrum of antibodies for the purpose of mastitis prevention (Kenny et al, 1992), and sufficiently high concentration of lactoferrin (Kai et al., 2002).

Authors have indicated that concentration of immunoglobulins and lactoferrin in the cow milk varies not only depending on the degree of infection of the udder but it is also affected considerably by the cow age, lactation period, keeping conditions, and feeding (Welty et al., 1976; Bishop et al., 1976; (Guidry et al. 1980(b); Guidry et al., 1980(a)); Olson et al., 1981; Guidry, Miller, 1986; Butler, 1994; McFadden et al., 1997; Zagorska et al, 2007).

During the last decade, investigations have been carried out to find out and to understand intensification possibilities of immunoglobulin A, G, M, and lactoferrin activity in the mammary gland. Studies mainly have analyzed experimentally caused acute mastitis; some studies have evaluated dynamics of immunoglobulins and lactoferrin in cows milk in cases of subclinical bacterial udder infections (Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003). Still in all, scientists from different countries in the world express rather contradictory opinions on the importance of immunoglobulin G, A, and M and lactoferrin in maintenance the udder functional status and health, as well as evaluate differently the role of different factors in the regulation of above mentioned defense components concentration.

Unfortunately, a conclusion should be drawn that evaluating dynamics of immunoglobulin A, G, M and lactoferrin in the cow milk, cow age, lactation period, functional status (health) of the udder as well as the keeping conditions and seasonal effect are ignored.

On purpose to understand and evaluate the role of immunoglobulin and lactoferrin in maintaining the udder health, we investigated the dynamics of immunoglobulin A, G, M and lactoferrin in milk in relation with somatic cell count in milk, and pathogenic bacteria presence in the mammary gland in relation with the keeping conditions during the housing and grazing periods.

In Latvia, such kind of investigation has not been carried out but the amount of immunoglobulin A, G, M and lactoferrin in the cow milk was estimated performing chemical composition examination of milk obtained in biological and conventional farming.

Summarizing theoretical achievements and judgments found in literature as well as the data obtained in the scientific studies, **the aim of the present study** was advanced to evaluate the dynamics

of immunoglobulin A, G, M and lactoferrin concentration and somatic cell count in cow milk in relation with the cow seasonal keeping and pathogens presence in the udder.

### **Objectives of the study**

1. Evaluate the functional status (health) of the cow udder by estimating somatic cell count and presence of pathogenic bacteria in milk during the housing and grazing period of the herd.
2. Estimate the change of immunoglobulin A, G and M concentration in the cow milk and blood serum in relation with the cows seasonal keeping and presence of pathogenic bacteria in the udder.
3. Analyze the lactoferrin concentration in the udder quarters milk in cows with and without pathogenic agents causing mastitis during the housing and grazing period.
4. Find out the possible correlation between the immunoglobulin A, G, M, lactoferrin concentration, and somatic cell count in milk.

### **Scientific novelty of the research**

- Analysis performed of conditionally good herd cows udder functional status, estimated the effect of changes of keeping conditions on the activity of natural defense response of the cow udder.
- Analysis and studies performed of the dynamics of immunoglobulin A, G, and M in the blood and milk as well as the dynamics of lactoferrin and somatic cell count in milk based on the seasonal keeping of cows, namely, in relation with the changes in the cow keeping conditions and feeding.
- A complex evaluation of the immunoglobulin A, G, and M concentration in the blood and milk, lactoferrin value and somatic cell count in milk depending on the presence of pathogenic bacteria in the udder.
- Investigation of the possible correlation between the amounts of immunoglobulin A, G, and M in the blood and milk; lactoferrin concentration and somatic cell count in milk.

**Volume of the research.** The doctoral thesis contains 118 pages consisting of the following parts: annotation, introduction, survey of scientific sources, methods, results, discussion, conclusions, recommendations for practice, references and annex.



## APPROBATION OF RESEARCH RESULTS

**The research results are approbated in the following scientific conferences**

1. 13<sup>th</sup> International Scientific conference „Production diseases in farm animals”. Leipzig, Germany, 29 July – 4 August 2007. *Seasonal variation of the lactoferrin concentration, somatic cell count and subclinical mastitis occurrence in cows.*
2. 11<sup>th</sup> International Scientific conference „Research for Rural Development”. Latvia, Jelgava, 19-21 May, 2005. *Immunoglobulins and Lactoferrin concentration in milk and bacteria causing subclinical mastitis in dairy cows.*
3. LUA FVM International Scientific Conference „Animals. Health. Food Hygiene.” Jelgava, 15 October 2004. *Changes of the lactoferrin concentration in the cow milk during the housing and grazing period, and its relation with the udder health parameters.*
4. ESDAR and EVSSAR International Scientific conference „Reproduction in Domestic animals”, Ireland, August 2003. *Seasonal variation in Immune activity and accurance of Subclinical mastitis of cows.*
5. LUA FVM International Scientific Conference „Animals. Health. Food Hygiene.” Jelgava, 14 November 2002. *Changes of the udder health parameters, and immunoglobulin content in cow milk during transferring to the grazing period.*
6. International conference of Animal Husbandry. Baisagola, October, 2001. *How the welfare conditions affect milk quality to Latvian brown cows.*
7. LUA FVM International Scientific Conference „Current Issues in Veterinary Medicine.” Jelgava, 29 September 2000. *Practical observations on the changes of somatic cell count in the cow milk.*

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Place and time of the study**

The doctoral thesis was worked out during the period from 2002 to 2010. The experimental part of the study was carried out on the farm “Pērles” of dairy cattle in Valmiera region Ķoņu district in 2002 and 2003.

In Laboratory of the Rīga Reproduction Centre (RRC), we estimated the lactoferrin concentration in milk, immunoglobulin A, G, and M concentration in milk and blood as well as examined the blood morphologically and biochemically.

In the Milk Quality Laboratory of the joint stock company “Rīgas piena kombināts” (Riga Milk Plant), somatic cell count in milk was estimated.

In the Problem Laboratory of Herd Health and Reproduction, milk microbiological examination was performed.

### **Characterization of the herd used in the study**

On the farm “Pērles” of dairy cattle, in Valmiera region Ķoņu district in the period of May 2002 to October 2003 there were 75 milking cows with the average milk yield 7156 kg per year. The average fat content in milk was 4.2%, protein 3.3%, somatic cell count in milk 255 000 cells per milliliter (thousand/ml<sup>-1</sup>).

The herd consisted of 24 Latvian brown breed cows, Holstein black-and-white variety cows, as well as 19 cows that were crossbred of the above-mentioned breeds. The age of cows was from two to eight years, and the average lactation number was 3.5 lactations. All cows of the herd were subjected to supervision.

The cows were kept in a no insulated or eased type of barn, loose, grouped and fed differently depending on their productivity and lactation period. The cow ration included ensilage, hay, mixed concentrated feed, root crops, as well as feed additives. As the bedding, in premises for cow keeping conifer sawdust was used. During the summer – autumn period cows were grazing in the day pasture, while in the winter and spring they were kept in the barn.

The cows were milked twice a day in a parlour with a “herringbone” type milking equipment at 6 o'clock a.m. and 6 o'clock p.m. Before milking, teats were cleaned with single-used napkins. Milk from each quarter first was squirted into a separate cup with a black bottom, and the milk quality was evaluated. Every time after milking, cow teats were disinfected.

As four cows were simultaneously milked in the milking parlour, the milkman had a possibility to follow systematically to the process of milking of each cow.

### **Schema of the research**

In 2002 and 2003 in total four times milk and blood were sampled from 16 cows and examined, which were selected as the herd-representing sample, and was included into the study group. Cows for the study (sampling and analyzing) were selected with the aim to:

- analyze milk obtained from clinically healthy udder quarters of cows at the middle stage of lactation;
- analyze milk and blood samples from cows of similar age (2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> lactation) and productivity (22-25kg milk per day);
- analyze samples from all the cow breeds in the herd to obtain a total view of the udder functional status (health) in cows of the herd and activity of defense components of udders under investigation. Thus, in the study group were included five Latvian brown breed cows, seven Holstein black-and-white variety, and four crossbreds of Latvian

brown and Holstein black-and-white breed cows that represented proportionally the cow breeds in the herd.

All cows included into the study group, were examined two times during the grazing period and two times during the housing period.

Milk and blood samples were taken from each study group cow at every examination. Milk was sampled from each udder quarter.

Primarily, milk samples from all quarters were tested with California Mastitis Test (CMT).

Quarter milk samples, in which CMT result showed “trace” of infection (1), “suspicious” (2) or positive (3) reaction, were examined microbiologically. Moreover, microbiological examination was carried out with samples of all four quarters in those cows that showed CMT result 1 or 2 even in one quarter. So in total, 111 milk samples were examined bacteriologically. Investigating the dynamics of somatic cell count, immunoglobulin A, G, M and lactoferrin in milk in relation with the seasonal keeping of cows, 214 milk samples were analyzed, but evaluating somatic cell count, immunoglobulin A, G, M and lactoferrin concentration in milk depending on the infection of mammary gland 111 milk samples were analyzed bacteriologically.

## **Methods of examination and sampling**

### **Morphological and biochemical examination of samples**

Results of blood morphological and biochemical analyses were evaluated in order to be sure that the cows included into the group of investigation were healthy.

The morphological examination of blood samples (mean erythrocyte size, haemoglobin concentration, number of thrombocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, phagocytic index, haematocrit index) and biochemical investigations (amount of total protein, globulins, urea, glucose, keratin, Ca, P, transferrin) were carried out in the “Riga Reproduction Centre Laboratory”.

Automatic analyzer MS-4 (Melet Schloesing Laboratories, Pontoise, France) analyzed blood samples. The blood was sampled from the tail vein in sterile single-used vacuumtainers.

### **Clinical examination of the udder and evaluation of milk samples**

In order to test and estimate the udder health status, in all cows included into investigation, we evaluated the udder and teats visually and palpated both before and after milking. The clinical examination of mammary gland we performed in compliance with criteria set by International Dairy Federation (IDF), 1987.

Prior to milking, milk from each quarter first was squirted into a separate cup with a black bottom, and the milk physical quality was evaluated - colour, smell, and consistence. Especial attention was paid to the presence of flakes, clots, and strings in milk. Evaluation of the milk samples was made according to the method described by M.Sandholm and S. Pyörälä (Sandholm, Pyörälä, 1995).

### **California Mastitis Test**

Further, to detect a subclinical mastitis in cows, we used an indirect method of detecting abnormal milk California Mastitis Test. The test is based on an estimate of numbers of somatic cells in milk. The reaction was evaluated according to the method described by Philpot and Nickerson (1997) estimating the intensity of milk viscosity in the plate compartments.

## **Microbiological examination of milk samples**

Milk samples were collected for laboratory examination aseptically in accordance with the method recommended by ISO 707<sup>(1)</sup> standard. Milk was sampled before the morning milking and delivered to laboratory in a thermo bag at temperature not exceeding +10 °C. Microbiological examination for identification of pathogenic microorganisms was made as soon as the samples were delivered to laboratory. Standard procedures to identify pathogenic microorganisms in milk were performed in compliance with IDF (1981) criteria and method described by Quinn et al. (2000).

To identify microorganism species, colonies were plated on the agar culture medium. The isolated microorganism cultures were biochemically identified by using Gram staining method, oxidase test, catalase test, and coagulation test.

### **Estimation of somatic cell count**

Somatic cell count was estimated in the Milk Quality Laboratory of the joint stock company "Rīgas piena kombināts" (Riga Milk Plant) complying with LVS EN ISO 13366-3:1997 "Milk. Estimation of somatic cell count", Fluora-optoelectronic method, where "Somacount 300" is used.

The direct Somacount measurement reading is somatic cell count in thousands per one milliliter (ml<sup>-1</sup>) of milk. The cell-counting instrument operates by optical fluorescence principle.

As SCC in milk in cows varies within the range from several hundreds to more than four million cells per milliliter, then in calculations natural logarithmic values ln(somat) are used to develop clearer graphs, in turn, in the textual part and discussion we used laboratory estimated somatic cell count in milk.

### **Estimation of lactoferrin and immunoglobulin concentration**

**For estimation of the lactoferrin concentration in milk**, a kit of reagents was used: D-4156 "Lactoferrin – IFA - BEST", series No. 33, quality standard TY 9398-045-23548172-2001.

The kit of reagents is made in the joint stock company Vector-Best, Russian Federation, and is applicable for quantitative estimation of lactoferrin in the blood serum and other biological fluids – blood plasma, urine, saliva, sperm, milk etc. The method is based on the solid phase immunoenzyme analysis by using polyclonal lactoferrin antibodies.

**For estimation of the immunoglobulin G, A, and M concentration in milk and blood**, kits of reagents were used: "MIKROANALIZ IgG", series No.11, quality standard TY 9398-337-00155866-99; "MIKROANALIZ IgA", series No. 11, quality standard TY 9398-337-00155866-99; "MIKROANALIZ IgM", series No. 11, quality standard TY 9398-337-00155866-99.

The kits of reagents are made in the joint stock company "НПО СИНЕКОЗ", Russian Federation, and are applicable for quantitative estimation of immunoglobulin G, A, and M by turbidimetry method in the blood serum and other biological fluids - blood plasma, urine, saliva, sperm, milk etc.

### **Statistical data processing**

The obtained research data were statistically processed by using SPSS program 11.0 (Statistical Package for Social Science) and Microsoft Excel packages.

Statistical data processing - mean parameters, standard deviation X (s), minimum, and maximum values were calculated. Descriptive statistical parameters - mean value, standard deviation, maximum, and minimum value were calculated by using SPSS data analysis tool Descriptive Statistics.

The advanced hypotheses were verified by p-value method, the calculated p-value was compared with a significance level  $\alpha=0,05$  (Arhipova, Băliņa, 2003).

To evaluate the qualitative effect of factors, one-factorial variance analysis was used, but for investigation of the effect of factorial interaction, we used a multi-factorial variance analysis.

Significance of the investigated factor was estimated by verifying  $H_0$  and  $H_1$  hypotheses (Arhipova, Băliņa, 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Evaluation of the functional status of the cow udder by estimating somatic cell count in the udder quarter milk

Various methods of early diagnostics and evaluation of mammary gland diseases have been investigated, developed and compared, still a universally recognized indicator of the udder health is somatic cell count (SCC) in milk. That is why in the present research, somatic cell count in milk was used as the indicator for the udder functional status evaluation.

Evaluating somatic cell count parameters in single quarter milk samples, quarters were divided into four groups (Figure 1).

**Group 1:** quarters in which SCC in milk does not exceed  $100\ 000\ \text{ml}^{-1}$ . This parameter, according to IDF definition, shows that quarters are healthy.

**Group 2:** quarters in which SCC in milk is within the range from  $100\ 000\ \text{ml}^{-1}$  to  $300\ 000\ \text{ml}^{-1}$ . This parameter, according to IDF definition, may be classified as possibly infected quarters.

**Group 3:** quarters in which SCC in milk is within the range from  $300\ 000\ \text{ml}^{-1}$  to  $500\ 000\ \text{ml}^{-1}$ . This parameter, according to IDF definition, indicates a latent or subclinically infected quarter.

**Group 4:** quarters in which SCC in milk exceeds  $500\ 000\ \text{ml}^{-1}$  that, according to IDF definition, shows evidence of subclinical or clinical mastitis.

Most part or 64% of all investigated quarters of cow udders were healthy, SCC in these quarters milk did not exceed  $100\ 000\ \text{ml}^{-1}$ . In turn, 20% of quarters were classified as possibly infected, SCC in milk was within the range from  $100\ 000\ \text{ml}^{-1}$  to  $300\ 000\ \text{ml}^{-1}$ . Latent or subclinically infected were 5% of quarters with SCC in milk from  $300\ 000\ \text{ml}^{-1}$  to  $500\ 000\ \text{ml}^{-1}$ , but 11% of quarters were affected by subclinical or clinical mastitis because SCC in milk exceeded  $500\ 000\ \text{ml}^{-1}$ .

In total, 84% of quarters produced milk where SCC did not exceed  $300\ 000\ \text{ml}^{-1}$ , and such bulk milk according to the Cabinet of Ministers Regulation No. 123, February 9 2010 “Veterinary, hygiene and safety requirements for fresh milk circulation” complies with the highest category milk by quality standards.

### Somatic cell count in milk during the housing and grazing period

During the course of investigation, a comparative evaluation of somatic cell count in milk was carried out in the housing and grazing period. The obtained results (Figure 2) suggest that the mean SCC in the analyzed samples is  $233\ 710\ (566.31)\ \text{ml}^{-1}$ ; in the housing period it is  $169\ 530\ (419.94)\ \text{ml}^{-1}$ , in turn, during the grazing period somatic cell count is considerably higher  $302\ 880\ (685.72)\ \text{ml}^{-1}$ . SCC in milk differs significantly ( $p<0.05$ ) in the grazing and housing period.

Results of our previous studies also suggest that somatic cell count in cow milk during the grazing period is significantly higher in comparison with that of the housing period (Kociņa, Antāne, 2000).

Most possible, this increase is facilitated by the effect of intensive environmental factors causing udder irritation as well as activation of the animal immune response in the grazing period. In publications, authors have mentioned that under effect of heat and stress leukocyte migration in the mammary gland increases (Elvinger et al., 1992) and SCC in milk elevates (Johnson, Vanjonack, 1975). Demelash (2005) reports that season affects significantly somatic cell count in milk; namely, in the grazing period in warm and humid weather the risk to fall ill with mastitis in cows is greater. More likely it is due to the udder contact with environmental irritants, including pathogenic microorganisms (Goldberg et al., 1992).

Westgarth (1975) and Demelash (2005) indicate that SCC in the cow milk is used to be very changeable even increased in such herds where the presence of pathogenic agents have not been detected in cows.

In order to determine how pathogens affect SCC in milk and evaluate their causative role of subclinical mastitis, quarter milk samples were investigated microbiologically.

### **Somatic cell count in milk in relation with the pathogens presence in the udder quarters**

The obtained results (Figure 3) show that the highest mean SCC is in those quarter milk samples in which the pathogenic mastitis agents were identified; and SCC is significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in milk samples without pathogenic mastitis agents,  $540\ 050\ \text{ml}^{-1}$  (802.18) and  $247\ 800$  ( $535.80$ )  $\text{ml}^{-1}$ , respectively. This confirms the statement that an important cause of increase of SCC in milk is udder infection (Philpot, Nickerson, 1997; Burveinich et al., 1998; Hamann, 2002).

Microbiological examination results of milk samples indicate that rear quarters are most often infected (67.7%), while a higher SCC is observed in the right lobe quarters both in the grazing and housing period. This suggests that the increase of somatic cell count in milk in cows during the middle stage of lactation not always is associated with the presence of pathogenic agents in the udder (Johnson, Vajonack, 1975; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995).

As studies show, the intensity of spread of the udder infection directly depends on the microorganism species that occur in the environment where cows stay. That how many cows infection will affect is determined by two main factors: microorganism virulence and individual abilities of the cow to resist the infection (Reneau, 1986; Ali-Vehmas, Sandholm, 1995).

The following pathogenic microorganisms were identified: in 52.9% of quarter milk samples *Coagulase Negative Staphylococcus - KNS* was found, in 26.5 of samples *Streptococcus uberis*, and in 20.6% of milk samples *Staphylococcus aureus*.

In the quarter milk infected by *Str. uberis*, we observed the highest mean somatic cell count  $779\ 880$  ( $1117.53$ )  $\text{ml}^{-1}$ . In the case of *S.aureus* infection, the mean SCC was  $566\ 420$  ( $480.88$ )  $\text{ml}^{-1}$ , but in the case of *KNS* infection, SCC in milk was  $409\ 880$  ( $728.78$ )  $\text{ml}^{-1}$ . Results of investigation demonstrate that SCC in milk significantly ( $p < 0.001$ ) differ depending on the type of pathogenic agents in the udder.

### **Somatic cell count in milk during the housing and grazing period in relation with the pathogens presence in the quarter milk**

To analyze the variation of somatic cell count in milk during the housing and grazing period in relation with the presence of pathogenic bacteria in the udder quarters, cow seasonal keeping and pathogenic mastitis agents were evaluated as related factors (Table 1).

The study results suggest that interaction of the cow seasonal keeping with pathogenic mastitis agents significantly ( $p < 0.05$ ) influence somatic cell count in milk.

In the **housing period**, the highest SCC in milk **817 000** ( $402.46 \text{ ml}^{-1}$ ) was determined in the case of *S. aureus* infection. A publication mentions that *S. aureus* most of all was isolated from milk samples in the winter and autumn period (Konošonoka, 2005). There are indications that *S. aureus* is a typical causative microorganism of chronic mastitis, and risk of being infected with it is increasing particularly when animal resistance is lowered (Ali-Vehmas, Sandholm, 1995). Our obtained results are likely to approve that during the housing period activity of *S. aureus* increases because the cow resistance decreases.

In the **grazing period**, the highest mean SCC **2 197 000** ( $930.55 \text{ ml}^{-1}$ ) was observed in milk infected by *Str. uberis*, whereas during the housing period SCC in milk in the case of this infection was only 375 000 ( $812.52 \text{ ml}^{-1}$ ).

*Str. uberis* is an environmental microorganism that is unable to live in the udder for a long time (Philpot, Nickerson, 1997). This fact allows advancing an assumption that the most serious source of infection is the pasture surroundings for the herd under investigation. It is found out that *Str. uberis* not always causes acute disease signs, and the infection is possible to restrict by improving the cow keeping and surrounding hygiene conditions (Philpot, Nickerson, 1997).

Authors have mentioned that in the case of inflammation SCC in milk indicates the severity degree of mastitis (Bramley, 1991). During the grazing period, virulence of some pathogenic microorganism species possibly might be higher, moreover, in the grazing period, natural defense abilities in cows intensify, and the udder immunological defense response is expressed more powerful.

Results obtained in the present research indicate that in the **grazing period**, in comparison with the housing period, SCC is significantly ( $p < 0.01$ ) higher, 358 340 ( $701.71 \text{ ml}^{-1}$ ) and 121 460 ( $240.33 \text{ ml}^{-1}$ ), respectively; that was also determined in milk samples **without pathogenic bacteria**. Most probably, it confirms the opinion on a non-infectious irritation of the udder as an important cause of SCC increase in cow milk (Ligers, 1971; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995; Kociņa, Antāne, 200; Demelash et al., 2005). Unfortunately, there is a great risk that the udder tissue irritation could be complicated by infection (Johnson, Vanonack 1975; Elvinger et al., 1991; Saloniemi, 1995; Ali-Vehmas, Sandholm, 1995).

### **Values of immunoglobulin G, A, and M in milk and blood serum**

While studying and analyzing values of immunoglobulins in milk and blood, we came to a conclusion that authors mostly focus their attention either on the role of pathogenic microorganisms or importance of lactation period in the changes of immunoglobulin concentration (Guidry et al., 1980 (a); Guidry et al., 1980 (b); Butler, 1983; Doymaz et al., 1988; Korhonen, Kaartinen, 1995; Korhonen et al., 2000; Diarra et al., 2003), but do not evaluate dynamics of these biologically active substances in wider interconnections.

It is known that the amount of immunoglobulin A, G, and M in milk varies remarkably among some individuals (Guidry & Miller, 1986), and all factors influencing their concentration are undiscovered yet (Deptula, 1987; Butler, 1994; Korhonen et al., 2000; Krol, 2010). As it is indicated in literature, in healthy cow milk during the middle stage of lactation, the concentration of all classes of immunoglobulins is low, but it increases during the udder inflammation (Sandholm, Korhonen, 1995; Korhonen et al., 2000).

Immunoglobulin values in milk obtained in the present research and standards given in literature are summarized in Table 2.

Comparing other authors indicated standards of immunoglobulin A, G, and M in healthy cow **milk**, in our investigation:

**IgG** concentration is higher; **IgA** and **IgM** concentration is higher but agrees with another research results carried out in Latvia (Zagorska, 2007).

Values in milk of all immunoglobulin classes under investigation, especially **IgM**, vary in wide ranges.

Whereas in the blood **serum**, **IgG** and **IgM** mean values are lower, 2.34 (0.91)  $\text{g l}^{-1}$  and 0.53 (0.52)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively, in comparison with the standards indicated by other authors; in turn, **IgA** concentration slightly exceeds the standards given in literature (Butler, 1994).

The obtained results possibly indicate that in the case of latent and subclinical udder inflammation, immunoglobulin G and M immigration from the blood circulation into the udder tissue is intensified in order to protect the udder from the manifestation of infection (Lascelles, 1979), and in that way the concentration of these immunoglobulins in milk increases but decreases in the blood serum. The increase of immunoglobulin G and M concentration is observed when cows do not have acute udder inflammation (Rainard, Caffin, 1983). In addition, lots of other milk-blood barrier regulating and influencing factors activity are possible, which determine immunoglobulin immigration from the blood circulation into the mammary gland tissue (Lewis-Jones et al., 1985).

**IgA** concentration in blood serum agrees with the values described in literature that possibly suggests that the needed **IgA** for the udder tissue protection, in contrast to **IgG** and **IgM**, basically is produced by local plasmatic cells, and does not immigrate from the blood circulation (Watson, Lascelles, 1973; Watson, 1980; Guidry et al., 1980(b)).

#### **Concentration of immunoglobulin G, A, and M in milk and blood serum during the housing and grazing period**

In publications, it is mentioned that immunoglobulin amount in the blood serum and milk in cattle varies significantly depending on the season, and it reaches the highest concentration in milk in the spring and summer (Guidry & Miller, 1986; Conesa et al., 2005; Konuspeyeva, 2007).

Our investigation also confirms that the cow seasonal keeping significantly affects immunoglobulin G and A concentration in milk, and immunoglobulin G, A and M concentration in the blood serum, and values of these immunoglobulins differ significantly ( $p < 0.001$ ) in the housing and grazing period.

Figure 4 clearly shows immunoglobulin G, A, and M values in milk during the housing and grazing period as well as dispersion of these values.

**Immunoglobulin G** in milk reached the highest mean value 2.26 (0.91)  $\text{g l}^{-1}$  during the **housing** period when that was the predominating globulin in the cow milk. In the grazing period, the mean **IgG** value in milk samples was 1.83 (0.67)  $\text{g l}^{-1}$ , and its quantitative predominance over other immunoglobulins in milk was little.

**Immunoglobulin A in milk** reached its highest mean value 1.83 (0.61)  $\text{g l}^{-1}$  in the **grazing** period, whereas in the housing period **IgA** mean value in milk was two times lower, namely, 0.93 (0.37)  $\text{g l}^{-1}$ . The mean values of immunoglobulin M in milk in the grazing and housing period were approximately equal 1.35 (0.88)  $\text{g l}^{-1}$  and 1.31 (1.00)  $\text{g l}^{-1}$ . Whereas results of another investigations in Latvia show evidence that **IgG** concentration in milk is significantly indifferent depending on the cow keeping conditions while **IgM** values differ significantly (Zagorska et al., 2007). Probably that indicates that in the seasonal cow keeping, the season is more apparent as the effect of keeping conditions.

In our studies, we established that immunoglobulin A concentration in milk increased significantly in cows in the transition period from the housing to grazing ( $p < 0.001$ ), thus **IgA**, the same as **SCC**, the highest mean value reaches in the grazing period. As it was described above, during the grazing period the udder is subjected to more intensive environmental influence and various types of irritants. The high **IgA** concentration in August most likely indicates that in protection of the mammary



gland tissue, together with SCC, primary and important role belongs exactly to IgA. This immunoglobulin is involved in the udder tissue defense already in early stage of their irritation, inhibits bacteria binding to the udder epithelial cells, agglutinates them, and neutralizes bacterial toxins (Watson, 1980; Korhonen, Kaartinen, 1995). In our opinion, you cannot agree with a statement, that secretory IgA in the cow udder is inactive because it binds with milk fat globules; consequently, it is unimportant in the udder tissue protection (Lascelles, McDowell, 1970; Tizard, 2000).

We have established that during the housing period IgG and IgM content in **milk samples** varies within a much wider range than in grazing period. The range of IgA values is not so much expressed, however a comparatively greater IgA value variations are observed in grazing period. Some sample values, especially in the grazing period, are beyond the standard deviation limits that probably demonstrates the important role of individual factor in production of immunoglobulins (Guidry & Miller, 19806).

In Figure 5, immunoglobulin G, A, and M values in the blood and variation amplitude of these values in the housing and grazing period are presented.

In the **blood serum**, the highest mean values of IgG, IgA, and IgM are in the grazing period 2.98 (0.89)  $\text{g l}^{-1}$ , 0.70 (0.20)  $\text{g l}^{-1}$ , 0.84 (0.61)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively, and they are significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in the housing period.

Possibly, that indicates the immune system activation processes occurring in relation with the loose keeping of cows, opportunities to move, availability of more valuable and good quality feed during the grazing period (Michalek et al., 1975; Deptula, 1987) as well as the increase of udder infection and irritation cases.

### **Values of immunoglobulin G, A, M in the milk and blood serum in relation with the infection of udder quarters**

There are different investigation results of immunoglobulin G, A, and M quantity in a normal and pathogenic microorganism infected mammary gland; and most often they provide information about the immunoglobulin dynamics in cow milk in the case of clinical and acute mastitis. As the literature data indicate, immunoglobulin G, A, and M amount in milk increases considerably during the udder inflammation when they get actively involved into immunological responses of mammary gland against the pathogens invading the udder (Harmon et al., 1975; Hidiroglou et al., 1992; Butler, 1994; McFadden et al., 1999). In the diseased udder milk, their concentration might increase 3-5 times (Sandholm, Korhonen, 1995), 10 and more times (Korhonen, Kaartinen, 1995)

The authors of the present study carried out investigations to find out immunoglobulin G, A, and M values in the cow milk and blood serum when they were not diagnosed acute and clinical udder inflammation.

#### **In milk samples**

**IgG** mean value in specimens with pathogenic agents and without pathogens differed slightly, 2.23 (0.84)  $\text{g l}^{-1}$  and 2.19 (0.69)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively; **IgA** mean value in samples without pathogenic agents was slightly higher than in samples in which mastitis agents were present, 1.49 (0.86)  $\text{g l}^{-1}$  and 1.23 (0.57)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively. Also **IgM** mean value was higher in samples without pathogenic agents, 1.71 (0.87)  $\text{g l}^{-1}$  and 1.45 (0.87)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively.

Mean values of immunoglobulin G, A, and M differed insignificantly in milk samples with and without pathogenic mastitis agents ( $p < 0.05$ ).

#### **In blood serum samples**

**IgG** mean value 2.17 (0.77)  $\text{g l}^{-1}$  was greater in those cow blood serum samples in which milk pathogenic microorganisms were discovered. In cows, which milk was pathogenic free, IgG mean value in the blood serum was 2.01 (0.67)  $\text{g l}^{-1}$ .

**IgA** mean values in the blood serum were similar to cows in the milk of which the presence of pathogenic microorganisms was established, and in cows, which milk was pathogenic free, 0.42 (0.22)  $\text{g l}^{-1}$  and 0.44 (0.16)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively.

**IgM** mean values in the blood serum were similar to cows in the milk of which the presence of pathogenic microorganisms was established, and in cows, which milk was pathogenic free, 0.32 (0.10)  $\text{g l}^{-1}$  and 0.30 (0.31)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively.

Immunoglobulin G, A, and M the mean parameters in the blood serum differed insignificantly depending on the udder infection in cows ( $p < 0.05$ ).

In figure 6, it is possible to compare immunoglobulin G, A, M values and their ranging amplitude in the cow blood serum in relation with the udder quarter infection.

Figure 6 shows that the mean parameters are very similar in both groups, however the ranging amplitude is larger in that cow blood serum, which udder is infected, especially it is observed concerning IgG maximum values. Some samples are beyond the standard deviation limits that probably suggests the important role of individual factor in production of immunoglobulins (Guidry & Miller, 1986).

Publications show that immunoglobulin G, A, and M concentration in the cow milk and blood considerably increases alongside with the udder infection (Butler, 1994). It was observed that in the case of clinical mastitis immunoglobulin in cow milk might increase considerably (Avery, Gordon, 1991; Korhonen et al., 2000), especially during an acute udder infection (Mackie, Logan, 1986).

We observed that in cows with latent and subclinical udder inflammation immunoglobulin G, A, and M values in milk and blood serum increased insignificantly in comparison with normal cows.

Possibly the present results give evidence that

- the increased concentration of immunoglobulin G, A, and M in the udder provides the udder tissue seromucous protection both in those cows that were diagnosed the presence of pathogenic microorganisms and those ones that were not;
- the increased concentration of immunoglobulin G and M in the udder is maintained by their immigration from the blood circulation, in turn, IgA is secreted of increased concentration in the udder tissue.

Performing an in-depth investigation, immunoglobulin G, A, and M concentration in the cow milk and blood serum were established in relation with the relevant pathogens present in the udder (Figure 7).

As the study data demonstrate, immunoglobulin values are as follows.

#### **In milk samples**

**IgG** highest mean value 2.70 (0.32)  $\text{g l}^{-1}$  is in the case of *Str. uberis* infection but the lowest value 1.35 (0.32)  $\text{g l}^{-1}$  is in the case of *S. aureus* infection, it is even lower than immunoglobulin G value in the healthy quarter milk. *KNS*, in turn, in the infected quarter milk is observed the largest ranging amplitude of values.

**IgA** values in infected quarter milk are lower than in normal quarter milk. The lowest value 1.20 (0.42)  $\text{g l}^{-1}$  is in the case of *S. aureus* infection, it is a little higher in the cases of *KNS* and *Str. uberis* infections, 1.30 (0.21)  $\text{g l}^{-1}$  and 1.29 (0.44)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively.

Also **IgM** values in the infected quarter milk are lower than in healthy udder quarter milk. Similar to immunoglobulin G and A, the lowest mean value 1.27 (0.49)  $\text{g l}^{-1}$  is observed in *S. aureus* infected quarter milk.

Immunoglobulin G, A, and M concentration in milk is not influenced by the pathogenic agent type present in the udder quarter ( $p < 0.05$ ).

Figure 7 shows that immunoglobulin G, A, and M in milk do not have great differences of the mean values taking into consideration particular pathogenic mastitis agents. A comparatively little IgG value increase in milk, however, is observed in the case of *Str. uberis* infection. It should be mentioned

that in milk samples with pathogenic agents, particularly in the case of *Str. uberis* and *S. aureus*, larger ranging amplitude of immunoglobulin values is observed than in samples where pathogenic microorganisms are not identified.

#### **In blood serum samples**

**IgG, IgA, and IgM** reach the highest mean values 2.62 (0.74)  $\text{g l}^{-1}$ , 0.51 (0.24)  $\text{g l}^{-1}$ , and 0.50 (0.46)  $\text{g l}^{-1}$ , respectively, in the case of *S. aureus* caused udder infection, in turn, *KNS* and *Str. uberis* pathogens are not able to cause the immunoglobulin concentration increase in blood.

The study results confirm that immunoglobulin G, A, and M mean values in the blood serum differ significantly depending on the pathogenic mastitis agent type present in the udder quarter (IgG  $p < 0.05$ , IgA  $p < 0.001$ , IgM  $p < 0.001$ ).

Results of the present study show evidence that during a latent and subclinical udder inflammation only *S. aureus* is able to cause the increase of immunoglobulin G, A, and M concentration in the cow blood serum.

There are reports that the immunoglobulin concentration in milk and blood should be evaluated in interconnection with pathogenic microorganism species causing mastitis, character of inflammation, and duration (Rainard, Caffin, 1983; Anderson et al., 1986). In milk, immunoglobulin concentration increases considerably during an acute udder inflammation (Guidry et al., 1980 (a); Östensson, Lun, 2008), particularly in the case of endotoxins induced mastitis (Persson et al., 1992), whereas during a chronic mastitis, for example in the case of *S. aureus* mastitis, differences of the amount of immunoglobulins has not been established (Doymaz, 1988).

An opinion is expressed that during the *Str. uberis* induced udder inflammation, opsonic activity in milk and blood serum is low, therefore specific antibodies do not protect the udder in the case of this infection (Hill et al., 1994). Our obtained results agree with the immunoglobulin G, A, and M low activity in blood serum in the case of *Str.uberis* udder infection, while in the milk during this infection IgG concentration is elevated. In addition, another investigation indicates that IgG participates in the udder defense in the case of acute and subacute infections caused by *Str. uberis* (Fang et al., 1998), possibly because lactoferrin as important defense factor of the cow udder inhibits little *Streptococci spp.* pathogens (Arnold et al., 1980; Reiter, 1985).

#### **Concentration of immunoglobulin G, A and M in milk during the housing and grazing period in relation with the infection of udder quarters**

Evaluating immunoglobulin G, A, and M concentration in milk in the housing and grazing period in relation with the presence of pathogenic agents in udder, we came to a conclusion that, contrary to SCC in milk, the interaction effect of seasonal keeping and pathogenic agents affect insignificantly the concentration of immunoglobulins in milk ( $p < 0.05$ ), however we observed some tendencies.

IgG mean value in milk during the housing period was higher both in samples with pathogenic agents and without them, in the grazing period, in turn, IgG concentration was higher in milk samples of non-infected udder quarters (Figure 8).

**IgA** mean value in the grazing period was higher both in samples with pathogenic agents and without them, moreover in the grazing period, IgA value was larger established in milk samples of non-infected udder quarters, similarly to IgG value (Figure 9).

The obtained results indicate once again that the IgG and IgA concentration increase in milk has a seasonal character, moreover in the grazing period immunoglobulin G and A concentration has a tendency to increase in non-infected quarter milk.

**IgM** mean value in the housing and grazing period was higher in milk of non-infected quarter milk, and during a year, it was approximately equal, while in the infected quarter milk during the housing period IgM values increased rapidly (Figure 10). Analyzing IgM values in milk it was

ascertained that under the influence of seasonal keeping the immunoglobulin concentration increased only in the infected quarter milk.

### **Values of lactoferrin in milk**

In scientific literature, mainly data on the activity of lactoferrin as an antibacterial factor are presented. It is indicated that in healthy cow milk during the middle stage of lactation lactoferrin concentration is low but it increases during the udder inflammation (Sandholm, Korhonen, 1995; Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003; Diarra et al., 2003). However, there are studies indicating that the lactoferrin amount in the cow milk is affected also by other factors, for example cow breed, age, health status, lactation period, keeping conditions of cows (Harmon, 1975; Senft et al., 1979; Welty et al., 1976; Kutila et al., 2003; Zagorska 2007; Konuspayeva et al., 2007). Data available on lactoferrin concentration in healthy cow milk are different. Publications mention that in the middle stage of lactation lactoferrin concentration in milk is from 0.02  $\text{g l}^{-1}$  to 0.35  $\text{g l}^{-1}$  (Wety, 1976), from 0.1  $\text{g l}^{-1}$  to 0.35  $\text{g l}^{-1}$  (Harmon, 1975) but in milk of cows affected by subclinical mastitis lactoferrin concentration is from 0.2  $\text{g l}^{-1}$  to 1.2  $\text{g l}^{-1}$  (Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003). In the case of clinical mastitis, lactoferrin concentration can reach even 8.0  $\text{g l}^{-1}$  (Harmon, 1975), and more (Korhonen, Kaartinen, 1995).

Our obtained results demonstrate that the mean concentration of lactoferrin in cow milk is 0.61 (0.50)  $\text{g l}^{-1}$  that is higher than standards in normal cows given in literature. Lactoferrin concentration in milk is widely ranging from 0.00  $\text{g l}^{-1}$  to 4.40  $\text{g l}^{-1}$ . Investigations have ascertained that lactoferrin concentration in milk considerably varies between some cows (Kutila et al., 2003) as well as within the udder quarters of one cow (Welty et al., 1976). Ranges of values within the udder quarters are explained by earlier diseased mastitis in any of the udder lobes (Watson, 1980).

### **Concentration of lactoferrin in milk during the housing and grazing period**

Publications show that the lactoferrin amount in milk varies considerably in relation with the season (Konuspayeva et al., 2007) and the keeping system of cows (Zagorska, 2007).

In the present research, the mean concentration of lactoferrin in milk during the housing period was 0.739 (0.54)  $\text{g l}^{-1}$  but in the grazing period 480.4 (0.55)  $\text{g l}^{-1}$ , and it was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the housing period. Thus, lactoferrin value in milk differs significantly ( $p < 0.05$ ) depending on the seasonal keeping of cows.

Figure 11 shows that during the housing period, when lactoferrin concentration is observed the highest, the ranging amplitude of its values is more expressed. Ranges are greater especially in direction to maximum values. Both in the grazing and housing period in some cows the deviation of lactoferrin values are considerably beyond the standard deviation limits that possibly approves the important role of individual factor in maintaining lactoferrin level (Watson, 1980; Kutila et al., 2003).

### **Concentration of lactoferrin in milk in relation with the infection udder quarters**

There are different research results on the lactoferrin amount and ranges of values in a healthy and pathogenic microorganisms affected mammary gland, and mainly the dynamics of lactoferrin values is studied in the case of clinical and acute mastitis (Bishop et al., 1976; Ellison et al., 1988; David et al., 1993; Kai et al., 2003).

Scientists have ascertained that during a subclinical inflammation of the udder the concentration of lactoferrin in milk of cows can increase from two to ten times (Kawai et al., 1999; Hagivara et al., 2003) but in the case of clinical mastitis even to 10-100 times (Korhonen, Kaartinen, 1995). A considerable difference exists between the lactoferrin concentration in milk during an acute

and subclinical udder inflammation. During a subclinical inflammation, the lactoferrin concentration makes only 1/3 of the concentration that is during an acute inflammation (Pereira et al., 1998).

Our results demonstrate that the lactoferrin mean value in milk samples without pathogens is 0.405 0.47  $\text{gl}^{-1}$ , and its content is within the range from 0.00  $\text{gl}^{-1}$  to 2.25  $\text{gl}^{-1}$ . In milk samples with pathogenic agents, the lactoferrin mean value is similar 0.4000 (0.40)  $\text{gl}^{-1}$ , but the value variations are less from 0.02  $\text{gl}^{-1}$  to 1.60  $\text{gl}^{-1}$ . The lactoferrin mean parameters in milk differ insignificantly in samples with and without pathogenic agents ( $p>0.05$ ).

Publications mention that the lactoferrin concentration in subclinical and clinical mastitis affected quarters milk varies depending on the bacteria species causing mastitis and their pathogenicity (Hagiwara et al., 2003; Ahmad et al., 2007). It is ascertained that in the case of all bacteria, except *Corynebacterium bovis*, caused mastitis, lactoferrin concentration in milk is considerably higher than its concentration in milk of healthy cows (Hagiwara et al., 2003).

We carried out an in-depth investigation and analyzed the lactoferrin concentration in milk separately of each case of pathogenic agent. Results demonstrate that lactoferrin reaches the highest mean value 0.437 (0.440)  $\text{gl}^{-1}$  in the case of *KNS* infection. During *S. aureus* and *Str. uberis* caused mastitis, lactoferrin mean values are lower 0.410 (0.551)  $\text{gl}^{-1}$  and 0.345 (0.107)  $\text{gl}^{-1}$ , respectively. Results of dispersion analysis show that lactoferrin mean parameters in milk differ significantly depending on the types of pathogenic agents in the udder quarters ( $p<0.05$ ). It should be mentioned that the highest lactoferrin value 2.25  $\text{gl}^{-1}$  was ascertained in non-infected quarter milk.

In Figure 12, the lactoferrin concentration in milk in relation with the pathogens present in the udder quarters is given.

It should be remarked that in some quarter milk samples there are observed very large deviation from the mean values, even beyond the standard deviation limits, particularly in samples without pathogenic mastitis agents.

Authors have investigated that lactoferrin as an important defense factor of the cow udder, inhibits little *Streptococcus spp.* pathogens due to the low need for iron (Arnold et al., 1980; Watson, 1980; Reiter, 1985), as well as exhibit low antibacterial activity against *S.aureus* ; (Nonnecke, Smith, 1984 (1); Rainard, 1986). However, other results show evidence that the mean lactoferrin concentration in milk produced in quarters infected by *S. aureus* and *Streptococci* is considerably higher than in the *KNS* infected quarter milk (Hagiwara et al., 2003).

It is ascertained that the lactoferrin concentration during the udder inflammation is dependent not only on the type of pathogenic agent but also on the infection character and duration (Harmon et al., 1975; Kawai et al., 1999; Hagiwara et al., 2003), reaching the highest concentration in the case of acute mastitis (Harmon et al., 1976; Kawai et al., 1999).

### **Concentration of lactoferrin in milk during the housing and grazing period in relation with the infection of udder quarters**

As it was above mentioned, lactoferrin values during the housing period were significantly higher ( $p<0.05$ ) in comparison with the grazing period. During the housing period in the infected and non-infected quarter milk the lactoferrin mean values were similar 0.500 (0.560)  $\text{gl}^{-1}$  and 0.516 (0.430)  $\text{gl}^{-1}$ , respectively. In the grazing period, in turn, there was a great difference between the infected and non-infected quarter milk, 0.953  $\text{gl}^{-1}$  and 0.319  $\text{gl}^{-1}$ , respectively. During the grazing period, the lactoferrin activity was higher in the infected udder quarters (Figure 13).

As it is above mentioned, during the grazing period SCC increases considerably in milk samples without pathogenic agents, while the concentration of lactoferrin in milk of non-infected quarters is higher in the housing period. Possibly, this confirms a statement that lactoferrin reacts actively, similar to somatic cells in the udder, also to a non-infectious irritation of the udder (Harmon

et al., 1975) but the SCC activity is higher in the grazing period in such cases, and lactoferrin in the housing period. The present research results demonstrate that interaction of the seasonal keeping and pathogenic agents affect significantly ( $p < 0.05$ ) the lactoferrin concentration in milk.

Probably, in our investigation lactoferrin values and dynamics of their variations in milk indicate that in cows with udder inflammation and healthy udders the increased lactoferrin concentration provides the udder protection and in bacterostatic and bactericidal way restricts mastitis distribution (Arnold et al., 1980; Kawai et al., 1999; Ka iet al., 2002; Hagiwara et al., 2003).

Iespējams, ka mūsu pētījumā iegūtās Lf vērtības norāda uz to, ka laktoferīna paaugstinātā koncentrācija tesmenī nodrošina tesmeņa seromukozo audu aizsardzību, gan tām govīm, kurām tesmenī identificēti patogēnie mikroorganismi, gan tām, kurām patogēni nav identificēti. Tādējādi bakteriostatiskas un baktericīdas darbības rezultātā laktoferīns ierobežo tesmeņu infekciju izplatību

### **Correlation between the immunoglobulin G, A, M concentration in milk and blood, the concentration of lactoferrin and SCC in milk**

Analyzing correlations with the aim to ascertain closeness of agreements and importance between the concentration of immunoglobulin G, A, M in milk and blood, lactoferrin concentration in milk and somatic cell parameters in milk, we came to a conclusion that none of the investigated parameters develop statistically important **close agreement**.

Paired correlation analysis gives evidence that statistically important ( $\alpha = 0.01$ ) **medium close negative agreement** exists between the following parameters:

between **IgG in milk** and **IgG in blood** there is a medium close negative agreement, the correlation coefficient  $r = -0.488$ ;

between **IgM in milk** and **IgM in blood** there is a medium close negative agreement, the correlation coefficient  $r = -0.458$ .

In addition, Guidry et al. (1980 (c)) results demonstrate that between **IgG in milk** and **IgG in blood** there is a negative correlation, and IgG is selectively transported from the blood circulation into milk. Caffin and Poutrel (1988) also confirm this, and they have defined more exactly that such correlation is observed in the milk of non-infected quarters.

Our investigation data show that also between **IgM in milk** and **IgM in blood** there is a medium close negative correlation, consequently by increasing IgM concentration in milk the concentration in blood decreases, and vice versa.

Publications have reported that the increase of IgM concentration in milk indicates a recent udder infection, and this immunoglobulin more intensely immigrates from the blood circulation in the udder tissue exactly during the early infection (Coico et al., 2003; Janeway & Travers, 1994). Therefore, we can assume that some cows have early stage subclinical inflammations of the udder, and IgM immigrated from the blood circulation into the udder takes an active part in the local udder defense responses.

A statistically important ( $\alpha = 0.001$ ) **medium close positive correlation** is developed by IgG in blood, IgA in blood, and IgM in blood:

**IgG in blood** and **IgA in blood**, correlation coefficient  $r = 0.532$ ;

**IgG in blood** and **IgM in blood**, correlation coefficient  $r = 0.894$ ;

**IgA in blood** and **IgM in blood**, correlation coefficient  $r = 0.486$ .

This possibly suggests that there are common reasons and regulatory mechanisms for the maintenance of Ig concentration of these classes in the blood serum.

**Lactoferrin together with immunoglobulin G, A, M in milk** develop statistically significant ( $\alpha=0.05$ ;  $\alpha=0.01$ ) but poor negative correlations:

**Lactoferrin** and **IgG**, correlation coefficient  $r = - 0.204$ ;

**Lactoferrin** and **IgA**, correlation coefficient  $r = - 0.143$ ;

**Lactoferrin** and **IgM**, correlation coefficient  $r = - 0.237$ .

The obtained results indicate the tendency that under the influence of the circumstances and features investigated the concentration of lactoferrin and immunoglobulin in milk changes in the opposite directions that was already confirmed in the above-described analysis of dynamics of lactoferrin and IgG, IgA and IgM in the housing and grazing period in relation with the udder infection.

The authors have published different opinions on the lactoferrin correlation with immunoglobulins present in milk. For instance, some studies report that lactoferrin activity with IgG can increase the lactoferrin antimicrobial abilities (Wang, Hurley, 1998), and that specific antibodies acting with lactoferrin create more powerful antimicrobial effect than every of the mentioned components separately (Bullen et al., 1972; Harmon et al., 1975). Studies carried out in Kazakhstan, suggest that between lactoferrin and immunoglobulins in milk exists a positive correlation (Konuspayeva et al., 2007); however, our obtained data disagree. Possibly, in the above-mentioned study the correlation between Ig and lactoferrin was found because their concentration in milk was investigated in the case of clinical and acute udder inflammation. Results of another investigation assert that in the stage of non-acute udder inflammation lactoferrin does not potentiates immunoglobulin activity, and mutual agreements of concentration between them are not observed (Moreau et al, 1983).

Within the framework of the correlation analysis it was ascertained that **somatic cell count** in milk does not develop statistically important correlation neither with immunoglobulins G, A, M nor lactoferrin. Some investigations show evidence that in the cow milk correlation between SCC and lactoferrin exists (Harmon et al., 1975; Hagiwara, 2003) as well as between SCC and immunoglobulin G, A, M (Rogers, Sygne, 1978; Atiekh, 1979). Other investigations demonstrate that the lactoferrin and immunoglobulin concentration in the cow milk increases proportionally SCC in milk (Hagiwara, 2003). It is also proved that in non-infected quarters IgG in the cow milk correlates with SCC, but the udder being infected, depending on the bacteria species, correlation decreases or disappears totally (Caffin, Potrel, 1988). Studies suggest that immunoglobulins and lactoferrin correlate positively with SCC in milk in the case of clinical mastitis (Harmon et al., 1975; Atiekh, 1979; Persson et al.m 1992) but in milk in the case of subclinical and latent infection the correlation with SCC is not observed (Atiekh, 1979). Assumptions are expressed that SCC, lactoferrin, and Ig values vary depending on the stage of infection, they are the highest during the acute udder inflammation, and correlations develop most often during this stage of inflammation (Harmon et al., 1975; Fang et al., 1998; Kawai et al., 1999; Hagiwara et al., 2003).

In the present research, the lactoferrin concentration, immunoglobulin concentration, and somatic cell count in milk changed mutually independently possibly because the analyses were performed in the milk of healthy and subclinically diseased quarter milk.

## CONCLUSIONS

1. The seasonal keeping of cows significantly affects somatic cell count ( $p < 0.05$ ), the lactoferrin concentration ( $p < 0.05$ ), and immunoglobulin G, A concentration in milk ( $p < 0.001$ ) as well as immunoglobulin A, M amount in the blood serum ( $p < 0.001$ ).
2. In the grazing period, compared with the housing period, somatic cell count increases significantly ( $p < 0.05$ ), and immunoglobulin A concentration in milk ( $p < 0.001$ ), as well as the immunoglobulin G, A, M amount in the blood serum ( $p < 0.001$ ); in the housing period, in turn, lactoferrin and immunoglobulin G amount in milk increases significantly,  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively.
3. In the subclinically infected udder quarter milk, somatic cell count increases significantly ( $p < 0.001$ ), while the lactoferrin and immunoglobulin G, A, M concentration differ insignificantly in the subclinically infected and healthy quarter milk ( $p > 0.05$ ). However, several pathogenic bacteria species infecting the udder quarters affect significantly lactoferrin concentration in milk ( $p < 0.05$ ), and immunoglobulin G, A, M amount in the blood serum ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ).
4. The effect of interaction of cow seasonal keeping and pathogenic bacteria presence in the udder affect significantly somatic cell count ( $p < 0.05$ ) and lactoferrin concentration in milk ( $p < 0.05$ ). In the grazing period, compared with the housing period, somatic cell count increases significantly in non-infected quarter milk samples ( $p < 0.05$ ), but the concentration of lactoferrin increases significantly in infected quarter milk ( $p < 0.001$ ).
5. A wide variation amplitude of immunoglobulin G, A, M in milk and blood serum, and lactoferrin in milk is observed that possibly indicates the important role of animal individual factor in the formation of defense response.
6. A high immunoglobulin G, A, M concentration in the cow blood serum and milk, as well as high lactoferrin concentration in milk are able to protect the udder from the infection manifestation and mastitis distribution in the herd.
7. Between the immunoglobulin G concentration in milk and blood serum ( $r = - 0.488$ ), and the immunoglobulin M concentration in milk and blood serum there is a medium close negative statistically important correlation ( $\alpha = 0.01$ ), but immunoglobulin G, A, M in blood serum develop statistically important ( $\alpha = 0.01$ ) medium close positive agreement ( $r = 0.532$ ;  $r = 0.894$ ;  $r = 0.468$ ).



## SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESIS

1. Kociņa I., Lūsis I., Antāne V. (2007) Seasonal variation of the lactoferrin concentration, somatic cell count and subclinical mastitis occurrence in cows. *13th International Conference Production diseases in farm animals*, Leipzig, p. 490.
2. Lūsis I., Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L. (2007) Changes in Immunological Parameters and Lactose in Cows with Increased Somatic Cell Count in Milk. *Proceedings from a Mastitis symposium at the St Petersburg State Academy of Veterinary Medicine*, Russia., p. 18.
3. Lūsis I., Kociņa., Antāne V., Jemeljanovs L. (2006) Piena somatisko šūnu skaita, laktozes un govs organisma imunoloģisko rādītāju sakarību vērtējums. (Evaluation of milk somatic cell count, lactose and immunological parameters correlation of the cow body.) *Proceedings of LUA VFM International Scientific Conference "Animals. Health. Food Hygiene."* Jelgava, pp. 166-170.
4. Kociņa I., Antāne V., Lūsis I. (2005) Immunoglobulins and Lactoferrin concentration in milk and bacteria causing subclinical mastitis in dairy cows. *Proceedings of LUA 11th International scientific conference „Research for rural development”* Jelgava, pp. 2005., 217-220.
5. Kociņa I., Antāne V., Lūsis I. (2004) Laktoferīna koncentrācijas izmaiņas pienā govīm kūststāves un ganību periodā, tā saistība ar tesmeņa veselības rādītājiem. (Changes of the lactoferrin concentration in the cow milk during the housing and grazing period, and its relation with the udder health parameters.) *Proceedings of LUA VFM International Scientific Conference "Animals. Health. Food Hygiene."* Jelgava, pp.145-149.
6. Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L., Lūsis I. (2003) Seasonal variation in Immune activity and accuracy of Subclinical mastitis of cows. *Proceedings from ESDAR and EVSSAR Scientific Conference Reproduction in Domestic animals*. Ireland, 38/4, p.345.
7. Kociņa I., Antāne V., Jemeljanovs L. (2002) Tesmeņa veselības rādītāju un imunoglobulīna satura izmaiņas pienā un asinīs, govīm pārejot uz ganību periodu.(Changes of the udder health parameters, and immunoglobulin content in cow milk during transferring to the grazing period.) *Proceedings of LUA VFM International Scientific Conference "Animals. Health. Food Hygiene."* Jelgava, pp. 110-115.
8. Kociņa I., Antāne V. (2001) How the welfare conditions affect milk quality to Latvian brown cows. *Animal Husbandry Scientific Articles, appendix 38*, Baisagola, pp.19-26.
9. Kociņa I., Antāne V. (2000) Praktiskie novērojumi par somātisko šūnu skaita izmaiņām govju pienā. (Practical observations on the changes of somatic cell count in the cow milk.) *Proceedings of LUA VFM International Scientific Conference "Current Issues in Veterinary Medicine."* Jelgava, pp. 84-89.